Higiene na indústria de alimentos

Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos

Nélio José de Andrade
Professor Titular
Universidade Federal de Viçosa

Livraria Varela
Revista Higiene Alimentar

Copyright © 2008 Livraria Varela, Revista Higiene Alimentar
Esta edição foi publicada com autorização de
Nélio José Andrade
Todos os direitos reservados

capa, diagramação, ilustrações e projeto gráfico:
www.std1.com.br

Ficha catalográfica preparada pela Bibliotecária Tereza Cristina Cardozo da Silva CRB-3 / 260

A553h
2008

Andrade, Nélio José de, 1952
Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos / Nélio José de Andrade.
-- São Paulo: Varela, 2008.
412p. : il.

Inclui bibliografia

1. Alimentos - Indústria - Aspectos sanitários. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. Bactérias - Adesão. 4. Biofilmes. 5. Água - qualidade. 6. Água - tratamento. I. Título.

CDD 22. ed. 664.07

Agradecimentos

À minha esposa Maria Eliza e às minhas filhas Priscila e Patrícia, pelo apoio irrestrito.

Aos amigos que a vida me proporcionou: Renato Cruz, Frederico Siqueira, Cláudio Furtado, Carlos Roberto, Benício Chaves, Júlio Maria e Antônio Carlos, pela fraternal convivência.

Às professoras e amigas Maria Elilce Lima Martyn, Magdala Alencar Teixeira e Nilda de Fátima Ferreira Soares, que sempre acreditaram em mim como profissional.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelo convívio.

A Edmund A. Zottola, professor emérito da Universidade de Minnesota, EUA, pelos ensinamentos.

Apresentação

A ocorrência de processos de adesão microbiana e formação de biofilmes no ambiente de processamento de alimentos tem de ser entendida, avaliada e controlada pelos responsáveis pela produção de alimentos com qualidades sensorial, nutricional e microbiológica, de forma a atender às expectativas dos consumidores.

Constatando a escassez de informações sobre o tema em publicações nacionais, os idealizadores do livro "Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e Controle de Adesão e Formação de Biofilmes Bacterianos" procuraram mesclar conhecimentos teóricos com resultados de pesquisas na área de Higiene Industrial. Esses estudos envolveram, nos últimos anos, mais de uma dezena de pesquisadores, doutorandos, mestrandos e estudantes de iniciação científica, no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

O livro divide-se em duas partes. Na primeira são abordados, em três capítulos, os mecanismos, as técnicas microscópicas e testes usados para avaliar a adesão e a formação de biofilmes. Na segunda parte, em sete capítulos são fornecidos conhecimentos teóricos e resultados de pesquisa para controle dessas ocorrências indesejáveis. Nessa parte do livro, é enfocada a relação ambiente de processamento de alimentos e processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes, com informações essenciais sobre a qualidade e tratamento da água, o uso de detergentes e sanitizantes, o controle microbiológico de processos e metodologias convencionais para avaliar e controlar a qualidade microbiológica do ar e de equipamentos, utensílios e manipuladores.

Os autores esperam que esta publicação possa contribuir para que a indústria de alimentos brasileira, por meio dos profissionais que nela atuam, esteja mais preparada e mais competitiva neste mercado cada vez mais globalizado e exigente.

Professor Nélio José de Andrade

Viçosa, Minas Gerais, 2008.

Autor/Pesquisador Principal

Nélio José de Andrade, Engenheiro-Agrônomo e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG e Doutor em Tecnologia de Alimentos pela UNICAMP-SP. Professor Titular do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV-MG

Co-Autores/Pesquisadores/Colaboradores

Aurélia Dornelas de Oliveira Martins, Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios e Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Cláudia Alencar Vanetti, Engenheira-Agrônoma, Mestra e Doutora em Fitopatologia pela UFV-MG.

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, Bioquímico-Farmacêutica pela UFJF-MG e Mestra e Doutora em Microbiologia Agrícola pela UFV-MG. Pesquisadora da EPAMIG-MG.

Cleuber Antônio de Sá Silva, Bioquímico-Farmacêutico pela UFJF-MG e Mestre e Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Eduardo Alves, Mestre em Agronomia (Fitopatologia), UFLA-MG, Doutor em Agronomia (Fitopatologia), USP-SP e Professor Adjunto da UFLA-MG.

Ernny Marcelo Simm, Engenheiro de Alimentos e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Gino Ceotto, Doutor em Física pela Unicamp e Professor Adjunto da UFV-MG.

Hamilton Mendes Figueiredo, Engenheiro-Agrônomo pela UFRA-PA e Mestre e Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG. Professor Adjunto da UFPA-PA.

Júnia Cápua de Lima, Engenheira de Alimentos e Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Kelly Cristina Silva Brabes, Zootecnista e Mestra em Ciência de Alimentos pela UFLA-MG e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Marcília Santos Rosado, Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela UFV-MG.

Maria Aparecida Antunes, Nutricionista pela UFV-MG e Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Maria do Socorro Rocha Bastos, Engenheira de Alimentos pela UFC-CE e Mestra e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG. Pesquisadora da EMBRAPA, Frutas Tropicais, Fortaleza-CE.

Patrícia Campos Bernardes, Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela UFV-MG.

Patrícia Dolabela Costa, Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios e Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Roberta Torres Careli, Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios e Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

Valéria Costa Salustiano, Nutricionista pela UFG-GO e Mestra e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV-MG.

O livro "Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos" é um aprofundamento de temas abordados no livro "Higienização na Indústria de Alimentos", publicado pelo mesmo autor, em 1996, pela Editora Varela.

Na obra atual, o Professor Nélio compartilha com os interressados em higiene e microbiologia de alimentos sua experiência adquirida nos últimos 30 anos como professor, pesquisador e orientador de estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. O livro é fiel à visão dos autores sobre os temas abordados e será de grande valia aos profissionais responsáveis pela produção de alimentos seguros, sob os aspectos físicos, químicos, microbiológicos, sensoriais e nutritivos, com enfoque principal no ambiente de processamento de alimentos e na sua relação com processos de adesão microbiana e formação de biofilmes.

Nélio José de Andrade é Professor Titular da área de Higiene e Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. É Engenheiro Agrônomo e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV e Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Foi Professor Visitante da Universidade de Minnesota, nos Estados Unidos da América. Há mais de 20 anos é pesquisador do CNPq, sendo, atualmente, classificado no nível 1C. É professor permanente do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV (PPGCTA/UFV), onde orienta ou co-orienta estudantes de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Participou em grande número de bancas de exame de qualificação e defesa de dissertação e de teses. Desde 1977, ministra aulas para estudantes de graduação dos cursos de Engenharia de Alimentos e Ciência e Tecnologia de Laticínios e para estudantes do PPGCTA/UFV. Profere palestras em eventos técnicos, simpósios e congressos, apresenta resumos em eventos científicos e já publicou um livro e inúmeros artigos em periódicos nacionais e internacionais.

Sumário

Capítulo 01

Adesão e Formação de Biofilmes Microbianos **15**

1. Microrganismos Envolvidos nos Processos de Adesão e Formação de Biofilmes Microbianos 18
2. Superfícies Envolvidas em Processos de Adesão Microbiana 28
   - 2.1. Aço Inoxidável 29
   - 2.2. Polímeros 32
3. Mecanismos da Adesão Bacteriana 37
4. Aspectos Termodinâmicos do Processo de Adesão Bacteriana 40
   - 4.1. Teoria Termodinâmica da Adesão 40
   - 4.2. Teoria DLVO 42
   - 4.3 - Teoria DLVO Estendida 42
5. Fatores Associados à Adesão Microbiana e à Formação de Biofilmes 44
   - 5.1 Apêndices Celulares 46
   - 5.2. Estrutura e Condições Ambientais do Biofilme 50
   - 5.3. Hidrofobicidade, Carga Elétrica e Rugosidade das Superfícies 52
   - 5.4. Formação de Exopolissacarídeo 55
6. Composição dos Biofilmes Microbianos 59

Referências 60

Capítulo 02

Técnicas em Microscopia Usadas no Estudo da Adesão e da Formação de Biofilmes Microbianos **67**

1. Introdução 68
2. Microscopia Óptica de Luz 69
   - 2.1. Tipos de Microscopias de Luz e suas Aplicações 70
   - 2.2. Microscopia Eletrônica 82
3. Aplicação da Microscopia no Estudo da Adesão e Formação de Biofilmes 99
   - 3.1. Microscopia de Força Atômica 99
   - 3.2. Uso da Microscopia de Força Atômica na Avaliação de Adesão de Microrganismos e Análise de Rugosidade de Superfícies 101
   - 3.3. Adesão Bacteriana em Diferentes Superfícies Avaliada pela Microscopia de Epifluorescência 111
   - 3.4. Adesão Bacteriana e Formação de Biofilmes Observada pela Microscopia Eletrônica de Varredura 113
   - 3.5. Avaliação de Superfície de Aço Inoxidável por MFA 114
4. Conclusão 114

Referências 116

Capítulo 03

Testes em Uso Simulado para Avaliação de Processos de Adesão e Formação de Biofilmes Bacterianos **121**

1. Introdução 122
2. Considerações Sobre o Sistema “Cleaning In Place” (CIP) 123
3. Sistema-Modelo de Circulação de Leite para Estudos de Adesão Bacteriana 126
   - 3.1. Adesão de ***Enterococcus faecium*** a Aço Inoxidável e sua Resistência a Agentes Químicos 127
   - 3.2 - Adesão de Células Vegetativas e Esporos Bacterianos a Superfície de Aço Inoxidável 133
   - 3.3 - Adesão de esporos de ***Bacillus cereus*** em Aço Inoxidável: Efeito do Fluxo e do Tempo de Adesão 147
   - 3.4 - Adesão de Esporos de ***Bacillus sporothermodurans*** a Aço Inoxidável e sua Resistência a Sanitizantes Químicos 150
4. Sistema-Modelo para Avaliação de Adesão Bacteriana e Eficiência Bactericida da Radiação Ultravioleta em Polietileno de Baixa Densidade 158
   - 4.1 - Adesão de ***Escherichia coli*** e ***Staphylococcus aureus*** a Polietileno e suas Resistências à Radiação Ultravioleta 161
   - 4.2 - Adesão de ***Bacillus sporothermodurans*** ao Polietileno e sua Resistência à Radiação Ultravioleta 174
5. Conclusão 178

Referências 179

Capítulo 04

Controle da Higienização na Indústria de Alimentos 181
1. Introdução 182
2. Fundamentos Básicos da Higienização 183
2.1. Superfícies Usadas no Processamento de Alimentos 184
2.2. Qualidade da Matéria-Prima e da Água 184
2.3. Características dos Principais Resíduos 188
2.4. Agentes Detergentes e Formulações 188
2.5. O Passo a Passo do Procedimento de Higienização 202
2.6. Sanitizantes 204
3. Avaliação da Eficiência do Procedimento de Higienização 218
3.1. Teste do ***Swab*** ***220***
3.2. Técnica da Rinsagem 221
3.3. Placas de Contato 221
3.4. Sedimentação de Microrganismos do Ar em Meio Sólido 222
3.5. Método da Seringa com Agar 222
3.6. Método da Esponja 223
3.7. Impressão de Microrganismos do Ar em Meio Sólido 223
3.8. Técnica do ATP-Bioluminescência 224
Referências 225

Capítulo 05

Controle de Doenças de Origem Alimentar no Processamento de Alimentos 227
1. Introdução 228
2. Os Fatores do Crescimento Microbiano e o Processamento de Alimentos 230
2.1. Fatores do Crescimento Microbiano 230
2.2. Alguns Aspectos do Processamento de Alimentos ***versus*** Fatores de Crescimento Microbiano 235
3. Avaliação de Surtos de Doenças de Origem Alimentar 239
3.1. Microrganismos Patogênicos 239
3.2. Elucidação de Surtos 256
Conclusão 265
Referências 266

Capítulo 06

Qualidade e Tratamento da Água no Controle de Adesão Microbiana na Indústria de Alimentos 271
1. Introdução 272
2. Monitoramento da Qualidade da Água 274
2.1. Características Sensoriais 276
2.2. Indicadores de Riscos à Saúde 277
2.3. Indicadores da Formação de Incrustações 278
2.4. Indicadores de Poluição 282
2.5. Indicadores da Qualidade Microbiológica 282
3. Aspectos do Tratamento da Água 289
3.1. Potabilização da Água 289
3.2. Tratamentos Específicos da Água na Indústria de Alimentos 292
Referências 303

Capítulo 07

Qualidade Microbiológica do Ar de Ambientes de Processamento na Indústria de Alimentos 305
1. Introdução 306
2. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Ar 307
2.1. Sedimentação em Placas 308
2.2. Impressão em Ágar 309

3. Resultados de Avaliação da Qualidade Microbiológica do Ar de Ambientes de Processamento 312
3.1. Em uma Unidade de Alimentação e Nutrição 312
3.2. Em uma Indústria de Processamento de Leite 315
3.3. Em uma Indústria de Produtos Cárneos 324
3.4. Em Microindústria de Processamento de Leite 327
3.5. Em Câmaras Refrigeradas de uma Indústria de Laticínios 328
Referências 331

Capítulo 08

Metodologias Convencionais para Análises Microbiológicas e Equipamentos, Utensílios e Manipuladores na Indústria de Alimentos. 333
1. Introdução 334
1.1. Método do ***Swab*** ***335***
1.2. Método da Rinsagem 337
1.3. Método da Placa de Contato 337
1.4. Método da Seringa com Ágar 338
1.5. Método da Esponja 338
2. Resultados de Avaliações das Condições Microbiológicas de Equipamentos, Utensílios e Manipuladores 339
2.1. Em Unidades de Alimentação e Nutrição 339
2.2. Em uma Indústria Processadora de Carne 340
2.3. Em Indústria de Laticínios: ***Staphylococcus*** spp em Superfícies de Equipamentos e Manipuladores 344
2.4. Em Microindústrias de Processamento de Leite 347
Referências 356

Capítulo 09

A Técnica de ATP Bioluminescência na Avaliação e no Controle de Processos de Adesão Microbiana na Indústria de Alimentos 359
1. Introdução 360
2. Uso de ATP-Bioluminescência para Avaliar a Qualidade da Água 366
3. Adesão Bacteriana em Superfícies de Aço Inoxidável Avaliada pela Técnica de ATP-bioluminescência 370
4. Condições Higiênicas de Equipamentos para a Produção de Leite Pasteurizado Avaliadas por ATP-bioluminescência 373
5. Adesão de Esporos de ***Bacillus sporothermodurans*** em Aço Inoxidável avaliada pela Técnica do ATP-bioluminescência 375
6. Interferência de Substâncias Orgânicas e de Microrganismos na Medida de ATP-Bioluminescência 377
6.1. Interferência de Substâncias Orgânicas Não-Aderidas a Superfícies 377
6.2. Interferência de Substâncias e Microrganismos Aderidos ao Aço Inoxidável AISI 304, n°4 383
Conclusão 385
Referências 386

Capítulo 10

Avaliação Laboratorial de Sanitizantes Químicos 389
1. Introdução 390
1.1. Teste da Diluição de Uso 392
1.2. Teste de Suspensão 393
1.3. Teste do Coeficiente Fenólico 395
1.4. Teste de Capacidade 396
1.5 Teste de Ação Esporicida 397
2. Avaliação da Resistência de ***Enterococcus faecium*** Isolado de Leite Cru aos Agentes Químicos Sanitizantes 397
2.2. Avaliação pelo Teste de Suspensão 400
3. Eficiência do Ácido Peracético sobre Esporos de ***Bacillus sporothermodurans*** Avaliada pelos Testes de Diluição de Uso e de Suspensão 400
3.1. Avaliação pelo Teste da Diluição de Uso 401
3.2. Avaliação pelo Teste de Suspensão 402
3.3. O teste de Suspensão ***versus*** o Teste da Diluição de Uso 403

4. Modelagem Matemática na Relação Tempo e Concentração de Ácido Peracético na Ação Esporicida sobre ***Bacillus sporothermodurans*** ***403***
5 . Registro de Sanitizantes em Órgãos Governamentais 405
5.1. Informações para Registro 406
5.2. Informações para Avaliação dos Princípios Ativos 406
5.3 Rotulagem 407
5.4. Classificação de Riscos dos Sanitizantes 408
6. Sanitizantes Aprovados no Brasil 409
7. Conclusão 410
Referências 411

Capítulo 01

Adesão e Formação de Biofilmes Microbianos

1. Microrganismos Envolvidos nos Processos de Adesão e Formação de Biofilmes Microbianos
2. Superfícies Envolvidas em Processos de Adesão Microbiana
   - 2.1. Aço Inoxidável
   - 2.2. Polímeros
3. Mecanismos da Adesão Bacteriana
4. Aspectos Termodinâmicos do Processo de Adesão Bacteriana
   - 4.1. Teoria Termodinâmica da Adesão
   - 4.2. Teoria DLVO
   - 4.3 - Teoria DLVO Estendida
5. Fatores Associados à Adesão Microbiana e Formação de Biofilmes
   - 5.1 Apêndices Celulares
   - 5.2. Estrutura e Condições Ambientais no Biofilme
   - 5.3. Hidrofobicidade, Carga Elétrica, e Rugosidade das Superfícies
   - 5.4. Formação de Exopolissacarídeo
6. Composição dos Biofilmes Microbianos
7. Referências

Nélio José de Andrade
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
Júnia Capua de Lima

Os microrganismos se depositam, interagem nas superfícies, iniciam o crescimento e, ao se liberarem, podem contaminar os alimentos.

As superfícies de equipamentos ou utensílios que entram em contato com os alimentos durante o processo de industrialização não devem contaminá-los ou aumentar a incidência de microrganismos, sejam alteradores ou patogênicos. No entanto, sabe-se que, sob determinadas condições, os microrganismos depositam-se, aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. Ao se multiplicarem, formam colônias e, quando a massa celular é suficiente para que a ela sejam agregados nutrientes, resíduos e outros microrganismos, forma-se o que é denominado biofilme microbiano (SNYDER, JR., 1992; SASAHARA; ZOTOLLA, 1993; ZOTOLLA, 1994; ZOTTOLA; SASAHARA,1994; HOOD; ZOTOLLA, 1995; ARCURI, 2000).

O desenvolvimento de biofilmes microbianos ocorre freqüentemente nas indústrias de alimentos, onde grande quantidade de nutrientes está disponibilizada aos microrganismos, por exemplo quando válvulas, gaxetas de borracha e as partes internas de tubulações de aço inoxidável são colonizadas por microrganismos (MAFU et al., 1990; ASSANTA et al., 1998; BERESFORD et al., 2001; LEREBOUR et al., 2004;). Nesses pontos, se não houver boa higienização, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento microbiano (CZECHOWSKI, 1990; HOLAH et al., 1990; MAFU et al.,1990; CAPENTIER; CERF, 1993; AUSTIN; BERGERSON, 1995; ALLISON et al., 2000).

A adesão microbiana e a formação de biofilmes ocorrem devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ZOTOLLA,1997). Os biofilmes são constituídos de bactérias aderidas às superfícies, que por sua vez são envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, formando depósitos, nos quais os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos, de natureza polissacarídica ou protéica, denominados glicocálix (CRIADO et al., 1994). Os biofilmes contêm, além de microrganismos, partículas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam depósitos onde os microrganismos continuam a crescer, resultando em um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. No biofilme, os microrganismos são mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização (CZECHOWSKI, 1990; HOLAH; THORPE, 1990; MOSTELLER; BOULANGE-PETERMANN, 1991; BISHOP, 1993; LECLERCQ; LALANDE, 1994).

A formação de adesão (Figura 1), ou biofilme, pode ser desejável, em alguns casos (Tabela 1), a exemplo daqueles existentes em biorreatores utilizados na pro-

dução de alimentos fermentados. As bactérias produtoras de ácido acético crescem, agregando-se em fragmentos de madeira, e convertem diversos substratos em vinagre. Esses agregados microbianos são também usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de águas residuárias, para remoção de matéria orgânica e inorgânica. No processo de potabilização de água, a remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de tri-halometanos pode ser feita por biofilmes microbianos submersos (TAKASAKI et al., 1992).

A adesão e formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis, sob diversos aspectos, na indústria de alimentos (Tabela 1), uma vez que eles podem tornar menos eficiente o processo de cloração da água (BEER et al., 1994); reduzir a eficiência de transferência de calor em trocadores de calor; diminuir o fluxo em tubulações; desencadear processos corrosivos; e, principalmente, tornar fontes de contaminação microbiana (BEER et al., 1992; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; BEECH, 2004). Sob o aspecto microbiológico, a adesão pode constituir-se de microrganismos alteradores e, ou, patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica (CRIADO et al., 1994).

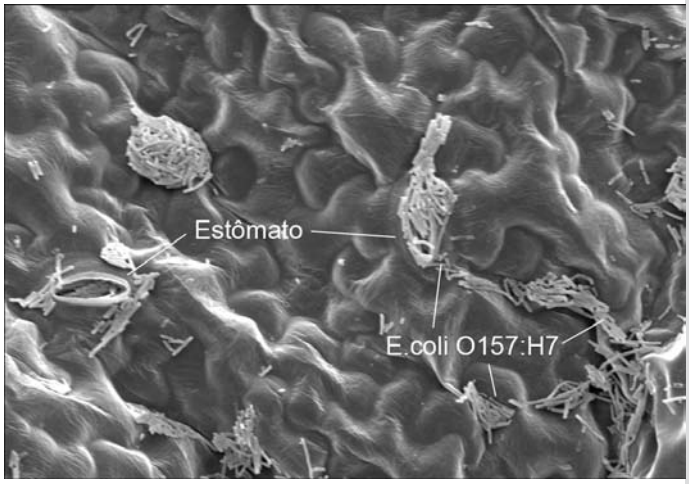


Figura 1 - Adesão de *Escherichia coli* 0157:H7 em superfície de alface.

Tabela 1. Aspectos desejáveis e indesejáveis da formação de biofilmes na indústria de alimentos

Aspectos desejáveis	Aspectos indesejáveis
Tratamento de águas residuárias, remoção de matéria orgânica e inorgânica	Corrosão de superfícies como de aço carbono e aço inoxidável
Potabilização de água, para remoção de carbono, nitrogênio e tri-halometanos	Aumento da resistência a sanitizantes químicos ou físicos
Processos fermentativos, por exemplo, na produção de vinagre	Contaminação microbiológica dos alimentos com bactérias patogênicas e, ou, alteradoras

1. Microrganismos Envolvidos nos Processos de Adesão e Formação de Biofilmes Microbianos

Diferentes microrganismos e superfícies participam do processo de adesão e formação de biofilmes.

O envolvimento dos microrganismos no processo de adesão e formação de biofilmes nas superfícies de equipamentos e utensílios para processamento de alimentos ocorre em vários níveis de intensidade. A liberação desses microrganismos poderá trazer conseqüências indesejáveis à qualidade do alimento produzido, como alteração deste e veiculação de patógenos.

Esses microrganismos podem ser originários de diferentes fontes primárias de contaminação, dentro da cadeia de processamento e comercialização dos alimentos, incluindo-se o solo, a água, as plantas, os utensílios, o trato intestinal de homens e animais, os manipuladores, a alimentação animal e o ar de ambientes de processamento.

Grande número de espécies de bactérias pode alterar alimentos. Dentre as mais importantes, incluem-se aquelas dos gêneros *Acetobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Alteromonas, Bacillus, Brochotrix, Campylobacter, Citrobcater, Clostridium, Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Micrococcus, Moxarella, Pediococcus, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio* e *Yersinia.*

Fungos filamentosos também alteram as propriedades dos alimentos, como as espécies dos gêneros *Alternaria, Aspergillus, Botritys, Byssochlamis, Cephalosporium, Colleotrichum, Fusarium, Geotricum, Helinthosporium, Monilia, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Sporotrichum, Thamnidium* e *Trichotecium*, bem como as espécies de leveduras dos gêneros *Brettanomyces, Candida, Debaromyces, Endomycopsis, Hansenula, Kloeckera, Kluyveromices, Mycoderma, Rhodotorula, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Schizosaccharomyces, Torulopsis* e *Trichosporon.*

Dentre as espécies bacterianas alteradoras, encontram-se *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fragi, Micrococcus* sp.*, Enterococcus faecium, Bacillus sporothermodurans, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus* e *Desulfovibrio desulfuricans* (BEECH; GAYLARDE, 1989; FLINT et al.,1997; ZOTTOLA, 1997; ANDRADE et al., 1998a; ANDRADE et al., 1998b; AKUTSU et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2000; FLINT et al., 2001; HJELM et al., 2002).

Exemplos típicos de microrganismos alteradores, que produzem grandes quantidades de limosidades, são as espécies do gênero *Pseudomonas* que apresentam as seguintes características: são bastonetes, Gram-negativos, em geral móveis, não formadores de esporos, apresentam apenas um ou um grupo de flagelos em uma ou em ambas as extremidades da célula; são capazes de fermentar grande número

de carboidratos, produzindo uma variedade de produtos que afetam o sabor dos alimentos; são proteolíticos e lipolíticos e sintetizam as vitaminas e os fatores de crescimento necessários ao seu desenvolvimento; apresentam tendência de crescimento em aerobiose, rápido desenvolvimento; produzem substâncias oxidadas e limosidades em superfícies de alimento, de equipamentos e utensílios para processamento; são também capazes de crescer em baixas temperaturas de armazenamento e produzir substâncias fluorescentes. A espécie *P. fluorescens* pode ser detectada quando aderida, considerando-se que produz compostos que emitem fluorescência sob luz ultravioleta.

Entre as espécies bacterianas patogênicas associadas à formação de biofilmes, incluem-se *Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Yersinia enterocolitica, Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* 0157:H7, *Staphylococcus aureus Bacillus cereus* (DOYLE, 1992; HOOD, 1996; PARIZZI, 1999; PARIZZI et al., 2004).

Uma microbiota bem diversificada, portanto, incluindo espécies Gram-positivas, Gram-negativas, esporulantes ou não, bastonetes, cocos em cacho (Figura 2), cocos em cadeia, psicrotróficos, mesófilos, termófilos e termodúricos, é envolvida em processos de adesão e formação de biofilmes na indústria de alimentos.

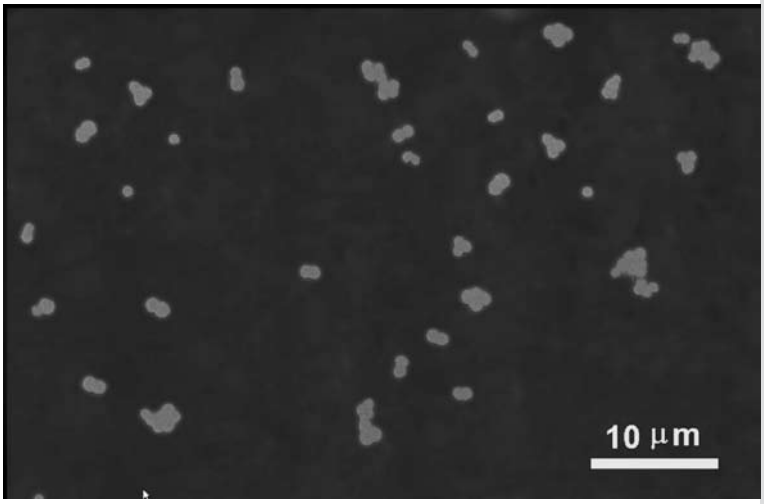


Figura 2 - Fotomicrografia de cocos em cacho.

Nos Estados Unidos, estima-se um gasto anual entre 5 bilhões e 22 bilhões de dólares no tratamento das doenças de origem alimentar, considerando todas as formas de contaminação dos alimentos por esses microrganismos patogênicos. Esses valores variam de acordo com a metodologia utilizada para se proceder à estimativa que pode incluir despesas hospitalares, perdas de horas de trabalho, gastos com a recuperação da doença e a estimativa de quanto as pessoas estariam dispostas a pagar para não contrair a doença. De acordo com *Center for Disease Control and Prevention*, o CDC, dos Estados Unidos, calculam-se 76 milhões de pessoas doentes por causa de alimentos contaminados, com 325.000 hospitalizações por ano e cerca de 35.200 mortes (CDC, 2006). Somente com salmoneloses o gasto estimado é de

1 bilhão de dólares anualmente. Cerca de 25 % dessas doenças estão associadas a matéria-prima, equipamentos e utensílios contaminados, sujeitos, portanto, à formação de processos de adesão microbiana.

Mais de 200 doenças podem ser causadas pelos alimentos contaminados, sendo os agentes etiológicos: bactérias, fungos micotoxigênicos, vírus, parasitas, toxinas, metais pesados, príons e agentes químicos, como resíduos de fungicidas, de inseticidas, de detergentes e de sanitizantes. Os sintomas variam de uma moderada gastroenterite a síndromes renais, hepáticas e neurológicas. Muitos dos patógenos de grande significado hoje, por exemplo *Campylobacter jejuni, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Cyclospora cayetanensis*, não eram reconhecidos há 30 anos como causadores de doenças provocadas por alimentos. A infecção por *Campylobacter jejuni* é causa comum de doença veiculada por alimentos nos Estados Unidos. Em 1996, 46 % dos casos confirmados reportados pelo CDC e pelo *Food and Drug Administration*, o FDA, foram causados por espécies de *Campylobacter*, seguida, em prevalência, por *Salmonella* (28 %), *Shigella* (17 %) e infecção por *Escherichia coli* O157:H7 (5 %) .

A Organização Pan-Americana de Saúde, a OPAS, coordena, desde 1995, o Sistema Regional de Informação para a Vigilância Epidemiológica das Doenças de Origem Alimentar. Entre 1995 e 1999, 22 países reportaram a esse órgão a ocorrência de aproximadamente 3.600 surtos, 114.000 casos e 210 mortes. O alimento envolvido foi diagnosticado em 2.540 dos surtos, que correspondem a 75 % do total. Os alimentos de origem animal tiveram maior participação, sendo responsabilizados em 1.457 surtos, o que representa 61,7 % do total. O agente causal foi identificado em 1.940 surtos, com predomínio dos agentes bacterianos, que se envolveram em 51,4 % dos casos. Os surtos causados por *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* foram os que mais contribuíram para a ocorrência das doenças de origem bacteriana.

A ocorrência de surtos, no Brasil, é de notificação obrigatória desde 1999, conforme Portaria GM/MS nº 1461, de 22/12/99. No entanto, há subnotificação que geralmente ocorre porque a doença pode se manifestar de forma branda, sem necessitar de tratamento médico, pelo fato de o consumidor não considerar importante o aparecimento de distúrbios gastrointestinais esporádicos e também desconhecer que pode e deve denunciar, a fim de evitar ocorrência de novos casos. A rotina sobrecarregada dos serviços de saúde, sem espaço para a notificação dos surtos de doenças de origem alimentar, também contribui para a subnotificação.

Nos dados disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde, o SUS, no período entre 1998 e 2001 a ocorrência de infecções intestinais é destacada como o principal diagnóstico, as quais são responsáveis por 4,5 % a 4,8 % das causas das internações hospitalares (ANTUNES, 2000). Dentre outras doenças envolvidas, encontram-se a cólera, febre tifóide, shigelose e amebíase. Tais doenças repre-

sentam cerca de 60 % do total de internações por doenças intestinais naquele período, sendo o grupo de causas com maior número de internações, em comparação com outras doenças infecciosas, como tuberculose, malária, dengue ou AIDS. Nesse período, o numero de internações por doenças infecciosas intestinais foi de aproximadamente 570.000, com valor total dessas hospitalizações para o país, em 2001, de cerca de 108 milhões de reais, enquanto em 1998 era de 74 milhões de reais. Em comparação com o número de internações por grandes grupos de causas, classificadas pelo Código Internacional de Doenças (CID 10/10ª Revisão da Classificação), as doenças infecciosas intestinais estão classificadas no 6º ou 7º lugar, considerando-se a população como um todo (SCZ, 2002).

Em Minas Gerais, entre 1995 e 2000, dados da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) demonstraram que 12.820 pessoas foram intoxicadas e 17 morreram após ingerirem alimentos contaminados por enterotoxina estafilocócica (Tabela 2).

Tabela 2. Surtos de intoxicação por enterotoxina estafilocócica ocorridos no Estado de Minas Gerais, entre 1995 e 2000

Alimentos envolvidos	Surtos	Pessoas acometidas	Óbitos
Queijos	23	660	01
Bolo recheado	20	750	
Refeição pronta	52	9500	16
Frango e embutidos	05	600	
Leite e derivados	06	380	
Massas	03	130	
Maionese caseira	03	800	
Total	112	12820	17

Fonte: FAPEMIG, 2002.

Com o desenvolvimento da epidemiologia e a melhoria dos serviços de vigilância em doenças causadas por alimentos contaminados, os fatores específicos que contribuem para a ocorrência de surtos ficaram evidentes, incluindo-se práticas, procedimentos e processos de fabricação deficientes.

Os fatores que contribuem para surtos de doenças de origem alimentar refletem perigos, e conseqüentemente o conhecimento desses fatores ajuda a estabelecer pontos críticos de controle no processo. Assim, é possível propor medidas para eliminar ou reduzir os perigos. A partir daí é possível traçar orientações para avaliar a probabilidade de ocorrência de um risco e a indicação de onde a verificação do monitoramento de um ponto crítico de controle é necessária. Esses fatores devem ser priorizados por legisladores, administradores de programas de qualidade, supervisores e inspetores em assuntos relacionados à segurança dos alimentos.

Em pesquisa sobre as percepções, experiências e comportamento preventivo em doenças causadas por alimentos contaminados nos Estados Unidos foram relacionados os principais fatores que levaram à ocorrência dessas doenças naquele país. Cerca de 65 % dos alimentos foram adquiridos em restaurantes, 17 % em supermercados, 17 % consumidos em residências e 1 % adquiridos de indústrias. Os principais fatores que causaram os surtos foram o consumo de sobras de alimentos ou após a data de validade (27 %), o resfriamento inadequado (23 %), alimentos contaminados e de fonte insegura (12 %), cocção inadequada (10 %), má higienização e contaminação cruzada (7 %) e reaquecimento inadequado (1 %).

Os esporos bacterianos (Figura 3) estão amplamente dispersos no ambiente, solo, ar e água, de onde poderão contaminar alimentos e superfícies e originar processos de adesão e formação de biofilmes. Os principais gêneros de bactérias que apresentam a capacidade de formar esporos são: *Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus, Sporossarcina, Oscillospira, Alyciclobacillus* e *Desulfotomacullum*, compreendendo espécies alteradoras e, ou, patogênicas. Os esporos têm grande importância na indústria de alimentos, por serem resistentes ao tratamento térmico, à radiação, à dessecação e aos agentes químicos. Além disso, são refráteis e absorvem fracamente os corantes comuns, mas podem ser observados empregando-se métodos especiais de coloração. São bastonetes ou cocos, às vezes apresentam-se sob a forma de filamentos, com diâmetro entre 0,3 e 2 μm e comprimento variando de 2 μm a 10 μm, podendo atingir 30 μm. A maioria das espécies na sua forma vegetativa é Gram-positiva e, em geral, tem flagelos peritríquios.

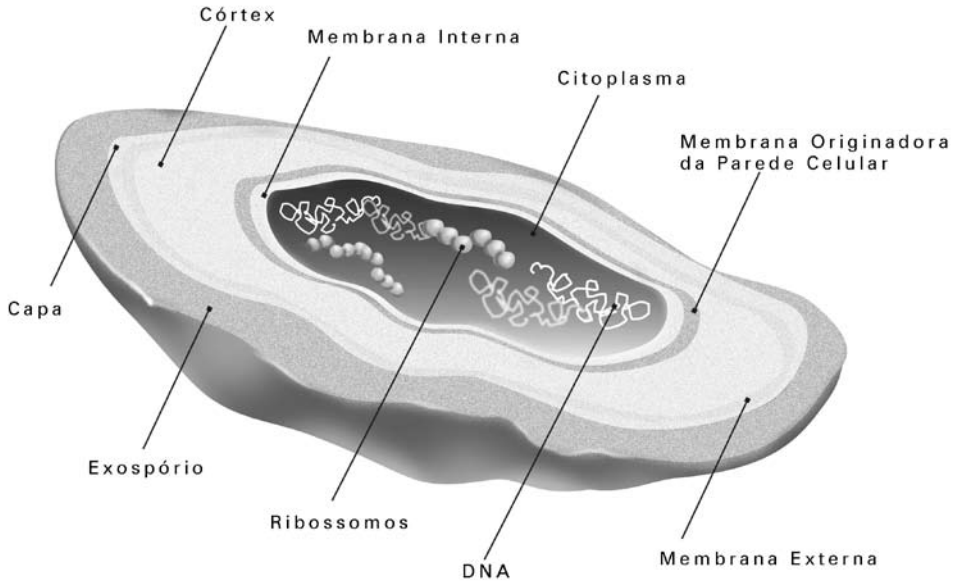


Figura 3 - Morfologia do esporo bacteriano.

A importância do controle dos esporos para alimentos pode ser evidenciada quando se observam as espécies bacterianas esporulantes. Dentre elas, encontram-se: i) *Clostridium botulinum*, que é a bactéria produtora da toxina mais letal das espécies bacterianas, sendo responsável por uma intoxicação neurotóxica, de letalidade elevada; ii) *Clostridium perfringens,* causador da intoxicação diarréica; iii) *Bacillus cereus,* responsável por síndromes eméticas ou diarréicas, dependendo da estirpe; iv) *Clostridium tyrobutiricum*, causador do estufamento tardio em queijos; v) *Alyciclobacillus acidoterrestris*, alterador de suco de laranja; vi) *Bacillus sporothermodurans*, resistente ao tratamento de Ultra Alta Temperatura, o UAT; vii) *Sporolactobacillus* spp., alterador de alimentos ácidos como o iogurte; viii) B*acillus stearothermophilus,* que apresenta alta resistência ao calor; viii) *Bacillus coagulans*, alterador de diversos alimentos; e ix) *Desulfotomaculum nigrificans*, um anaeróbio estrito, que utiliza nitrato, sulfitos e enxofre como aceptores de elétrons, reduzindo-os a ácido sulfídrico, com formação de pigmentos negros em diversos alimentos.

O controle de *Bacillus sporothermodurans* na indústria de alimentos é, particularmente, importante no processamento do leite esterilizado pelo sistema UAT (ZARCACHENKO; LEITÃO, 1999). Esta espécie bacteriana formadora de esporos possui alta resistência ao calor e é capaz de resistir ao tratamento UAT (Tabela 3). Foi detectada pela primeira vez em leite UAT, na Itália e Áustria, em 1985 (PETTERSSON et al. ,1996). São bactérias estritamente aeróbias, não produzem ácidos a partir de açúcares como celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, manitol, manose, rafinose, salicina e xilose e apresentam reação positiva nas provas de catalase e oxidase e negativa no teste de Voges-Proskauer; não reduzem nitrato a nitrito e não utilizam citrato como fonte de carbono. As estirpes estudadas hidrolisaram a esculina, e a maioria delas hidrolisou fracamente a caseína e não hidrolisou arbutina, arginina, gelatina e uréia, à exceção de uma estirpe.

Tabela 3 - Características do *Bacillus sporothermodurans*

Estritamente aeróbio
Espécie mesofílica
Esporos altamente resistentes ao calor, com valor $D_{140\,°C}$ = entre 3 e 6 minutos
Não causa alterações físico-químicas ou sensoriais perceptíveis
Nenhuma evidência de patogenicidade das estirpes estudadas
Contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ UFC.mL^{-1} de leite UAT não atendem à legislação atual

As células cultivadas em laboratório apresentaram-se sob a forma de bastonetes alongados e filamentosos, superiores a 30 μm de comprimento e 0,7 μm de diâmetro. São indefinidas quando submetidas à coloração de Gram, apresentam-se

com aspecto granular semelhante a um cordão de pérolas e motilidade por meio de flagelos peritríquios (PETERSSON et al., 1996). Não há evidências de que esse microrganismo seja patogênico, conforme estudos realizados. Essa espécie bacteriana pode ser encontrada não apenas em leite UAT integral e desnatado, como também em leite evaporado e leite reconstituído (KLIJN et al.,1997; HAMMER et al., 1995).

De acordo com relatos da Associação Brasileira de Leite Longa Vida, a ABLV, no Brasil, a partir de maio de 1997, alguns lotes de leite UAT apresentaram problemas quanto ao atendimento dos padrões microbiológicos exigidos pelo Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade quanto à contagem de aeróbios mesófilos, detectados pelo Serviço de Inspeção Federal, o SIF, do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, o MARA. De acordo com os resultados dos laudos, os produtos desses lotes não apresentaram alterações físico-químicas e, ou, sensoriais quando comparados com o leite UAT próprio para o consumo, apresentando produtos com acidez, pH, estabilidade de proteína ao álcool, sabor e odor normais. No entanto, contrariavam, do ponto de vista legal, as normas em vigor, no que se refere à contagem de aeróbios mesófilos. Sckoken-Iturrino et al. (1996) mostraram a ocorrência de bactérias esporulantes (Figura 4) do gênero *Bacillus* em amostras de leite UAT, no Brasil, relatando que 6,25% dos produtos estavam com contagens acima de 10^2 UFC.mL^{-1}, o que contraria o padrão exigido pela legislação para o produto quanto à contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, que é de até 1,0 x 10^2 UFC.mL^{-1} (Portaria SVS/MS, nº 451/97).

As etapas da transformação de uma célula vegetativa em esporos são comuns a todas as espécies que esporulam (Figura 4): **Estágio 0** - Corresponde à célula vegetativa. **Estágio I** - O material nuclear condensa-se, para formar um único filamento axial de cromatina. **Estágio II** - Forma-se um septo pela invaginação da membrana celular, e o esporo desenvolve-se num dos pólos da célula. **Estágio III** - O protoplasma do esporo é envolvido por duas membranas, formando o foresporo, que já se encontra livre na célula. **Estágio IV** - Entre as membranas do foresporo, são formados a camada originadora da parede celular, a partir da membrana interna, e o córtex, a partir da membrana externa. **Estágio V** - Formação da capa e incorporação de cálcio. **Estágio VI** - O esporo encontra-se maduro. **Estágio VII** - Ocorre sua liberação após a lise da célula-mãe.

A estrutura dos esporos é diferente em relação à das células vegetativas (Figura 5), a qual é constituída por camadas concêntricas que se apresentam nas formas ovais ou esféricas. Essa estrutura, quando observada do centro das camadas para o exterior, é: primeiro o protoplasma ou core, que contém DNA, RNA, enzimas e ribossomos, ou seja, o material genético que deve ser protegido para originar uma

nova célula vegetativa. Segundo, envolvendo o protoplasma, há uma membrana interna que origina a membrana celular e uma camada que forma a parede celular da nova célula vegetativa. Na seqüência, encontram-se a membrana externa e o córtex, formado de peptideoglicano, que confere resistência ao esporo a tratamentos térmicos. A capa do esporo, que é a camada mais externa, é constituída por uma ou mais camadas de proteína, com alto conteúdo dos aminoácidos metionina ou cisteína com ligações dissulfídicas (S-S). Essas ligações não são reduzidas pelos agentes oxidantes, o que confere resistência aos sanitizantes mais comuns usados na indústria de alimentos, incluindo cloro, iodo, ácido peracético e compostos quaternários de amônia. Alguns esporos apresentam uma última camada, o exospório, constituída por lipopolissacarídeos. Quando o esporo se transforma em célula vegetativa, o córtex, a capa e o exospório são hidrolisados.

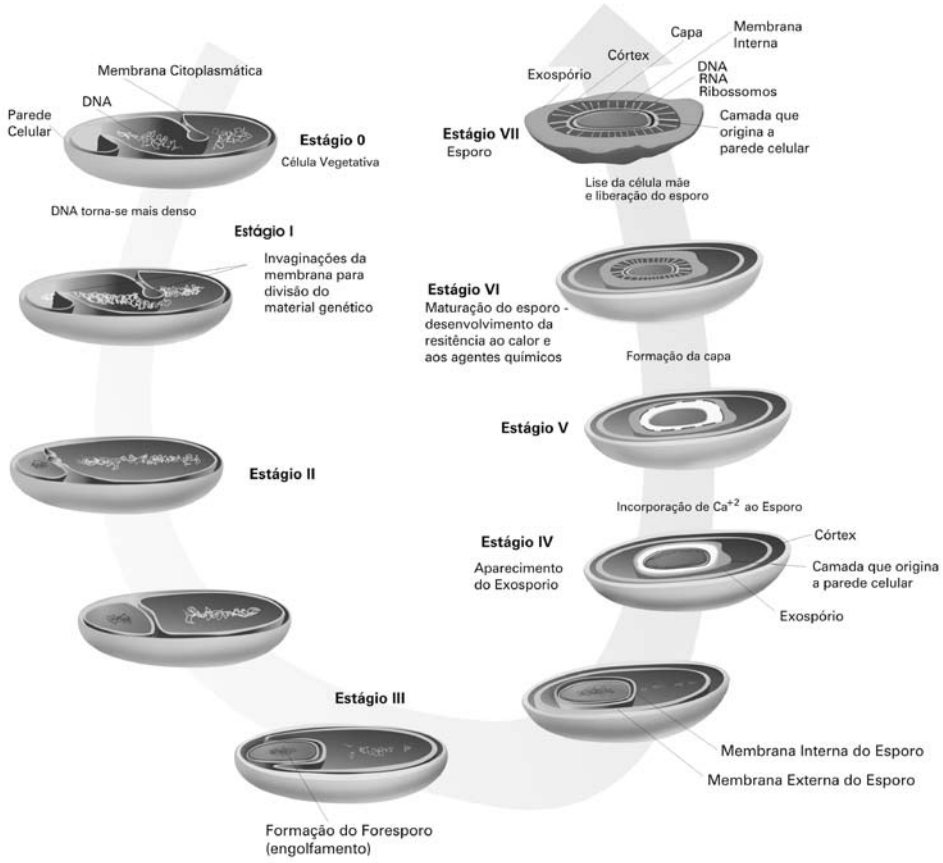


Figura 4 - Transformação de célula vegetativa em esporo.

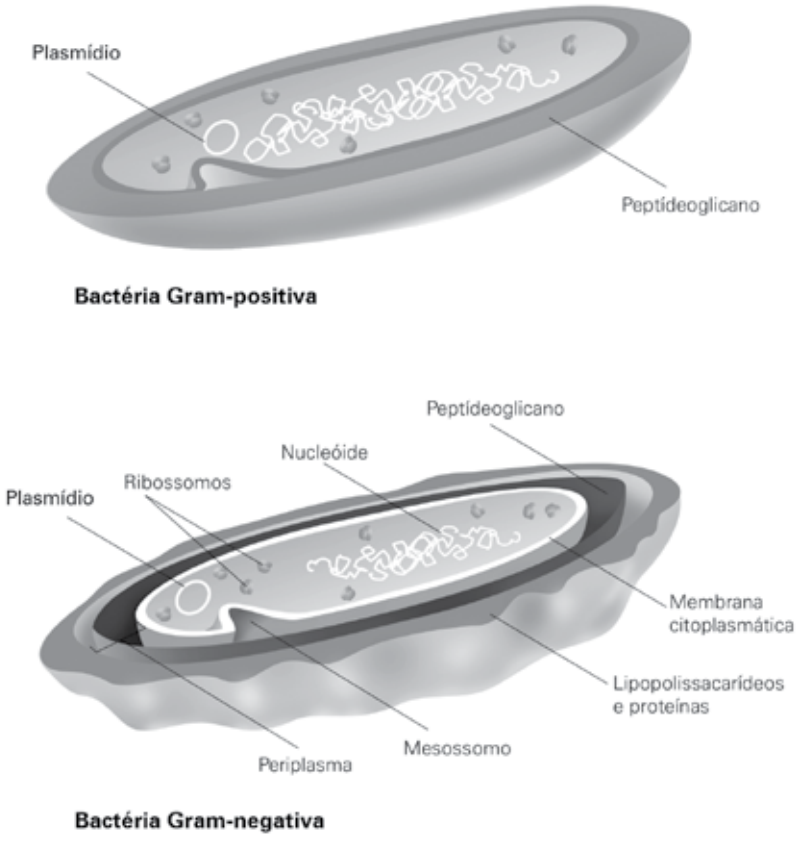


Figura 5 - Morfologia de células vegetativas bacterianas.

A transformação do esporo em célula vegetativa compreende as etapas de ativação, germinação, crescimento pós-germinação e multiplicação (Figura 6). A ativação ocorre por tratamentos subletais, que não provocam alterações importantes no esporo, resistente a agentes químicos e ao calor. Essa etapa pode ser iniciada por exposição a tratamentos térmicos, alterações de pH, substâncias alcalinas ou ácidas e outros agentes químicos. A germinação é um processo degradativo que torna os esporos sensíveis ao tratamento térmico e aos agentes químicos. Os esporos perdem cálcio, ácido dipicolínico e a refratibilidade; além do mais, são capazes de absorver corantes, e a sua densidade ótica é diminuída. A germinação requer a presença de substâncias químicas; entre estas: aminoácidos, como L-alanina e L-cistina; ribosídeos, por exemplo inosina e adenosina; e açúcares, como glucose e frutose, além de lactato, bicarbonato e dipicolinato de cálcio.

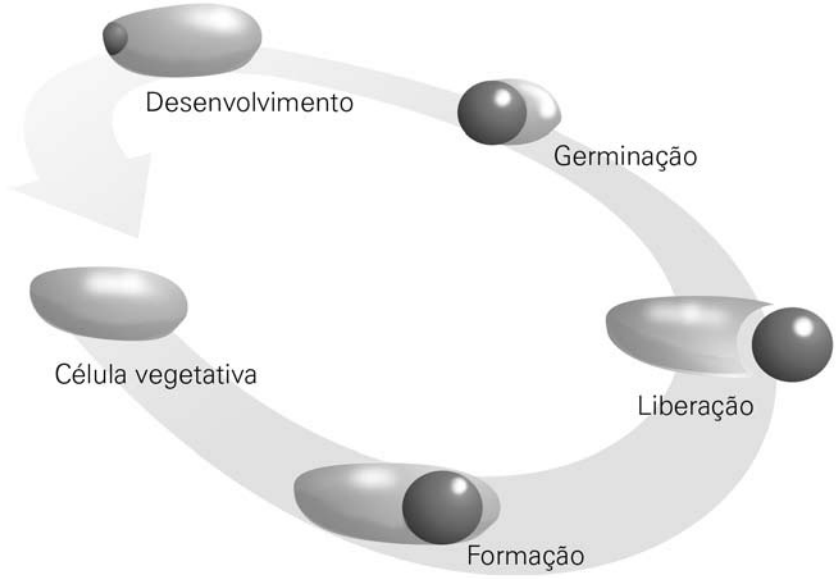


Figura 6 - Transformação de esporo bacteriano em célula vegetativa.

No crescimento pós-germinação, os esporos intumescem em razão da entrada de água e nutrientes e, em seguida, alongam-se, originando uma nova célula vegetativa, quando, então, ocorre a síntese de proteínas, a de parede celular e a de enzimas essenciais à multiplicação. A síntese de DNA ocorre durante a fase de alongamento. A última etapa do processo é a multiplicação, que ocorre quando os microrganismos aumentam em número, trazendo uma série de conseqüências para os alimentos.

Segundo Anderson et al. (1995), os esporos de *B. cereus* aderem com facilidade a diferentes superfícies, sendo essa capacidade de adesão devida a três características: alta hidrofobicidade, baixa carga de superfície e morfologia dos esporos, já que possuem apêndices, que também são responsáveis pela adesão. A espécie *Clostridium bifermentans* possui um tipo de apêndice que se projeta para o exterior, a partir de um único ponto no esporo. O corte transversal desse apêndice revela que eles são constituídos de três camadas concêntricas de subunidades de pequena densidade eletrônica, o que pode influenciar a adesão bacteriana (SAMSONOFF et al., 1970; BROCK et al.,1994).

De acordo com Desrosier e Lara (1981), alguns esporos bacterianos apresentam apêndice chamado de pili. Estudos mostram que os esporos de pelo menos 16 estirpes de *B. cereus* possuem, em média, oito pilus, que se encontram distribuídos aleatoriamente no esporo, auxiliando-o em sua adesão.

O motivo pelo qual o esporo bacteriano apresenta forte hidrofobicidade não é ainda bem entendido. Sabe-se que a adesão desses esporos às superfícies da linha de processamento e aos equipamentos da indústria constitui problemas para a obtenção de alimentos com qualidade. Ronner et al. (1990) realizaram estudos com esporos das espécies *B. cereus, B. licheniformis, B. polymyxa, B. subtilis e B. stearothermophilus*, com a finalidade de analisar o seu grau de hidrofobicidade. Eles constataram que o esporo de *B. cereus* foi mais hidrofóbico, com cerca de 45 % de adesão, enquanto o de *B. licheniformis* e o de *B. polymyxa* apresentaram entre 10 % e 20 %. No entanto, o grau de adesão de esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* não ultrapassou 5 %. Observou-se, com base em trabalhos desenvolvidos, que, em geral, os esporos mostraram maior capacidade de adesão tanto em superfícies hidrofóbicas quanto em hidrofílicas, quando comparados com suas células vegetativas.

Dos esporos analisados, o de *B. cereus* é o único que não apresenta exospório, e sua estrutura externa é composta principalmente de proteínas (52%), lipídios (13%) e fosfolipídios (6%). Segundo (Ronner et al. (1990), o exospório pode contribuir para a alta hidrofobicidade e o alto grau de adesão. Também, a pili pode estar envolvida na sobreposição da força de repulsão eletrostática, entre as superfícies do esporo e do processamento de alimentos.

Esporos de *B. cereus* têm importância na indústria de laticínios, pois, quando se apresenta em números iguais ou superiores de 10^6 UFC por mL ou g, podem causar doenças através dos alimentos, além de produzirem proteases e fosfolipases extracelulares, resultando na coagulação doce e no sabor amargo do leite pasteurizado (COLLINS, 1981). Larsen e Jorgensen (1997), examinando cerca de 458 amostras de leite, coletadas em três diferentes indústrias, observaram que 56% delas apresentavam *B. cereus*, devendo-se ressaltar que, no verão, esse valor atingia 72 %, contra 28 % no inverno. *B. cereus* psicrotrófico foi detectado em 29 de 115 amostras de leite cru e em 120 de 257 amostras de leite pasteurizado, tendo as células viáveis sido encontradas dentro de uma variação de 1,0 x 10^3 UFC.mL^{-1} a 3,0 x 10^5 UFC.mL^{-1}. Giffel et al. (1997) avaliaram a incidência do microrganismo *B. cereus* em tanques de refrigeração de leite, observando que 40 % de 133 amostras estavam contaminadas com o microrganismo.

2. Superfícies Envolvidas em Processos de Adesão Microbiana

De acordo com muitos autores (LÓPEZ, 1970; STEVENS, 1990; CZECHOWSKI, 1990; HAYES, 1993; PALMER, 1998; VERGNAUD, 1998; RODRIGUEZ, 2002; RODOLFO JR; NUNES, 2002; INSTITUTO DO PVC, 2004;), o material das superfícies comumente

usado no processo de alimentos como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro, permite o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes, segundo vários autores (CONSTERTON et al., 1978; COSTERTON et al., 1987; CONSTERTON et al., 1989; MARSHAL, 1992; SASAHARA; ZOTOLLA, 1993; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; COSTERTON et al., 1995; HOOD; ZOTOLLA, 1995; BOWER et al., 1996; HOOD, 1996; SAND, 1997; ZOTTOLA, 1997; HERALD; ZOTTOLA, 1998; STICLER, 1999; O'TOOLE et al., 2000; LEJEUNE, 2003).

As características dessas superfícies de processamento são apresentadas na Tabela 4 e devem ser inertes, tanto no que se refere aos alimentos quanto ao que se concerne a detergentes e sanitizantes sob condições normais de uso. Além disso, seus componentes não devem ser tóxicos, não podem migrar nem ser absorvidos pelos alimentos. As superfícies lisas, duras, contínuas sem fendas ou fissuras são as mais indicadas para contato sem deformações, como o abaulamento. As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado. As características macroscópicas e particularmente microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos com microrganismos alteradores ou patogênicos. Quanto mais lisa a superfície, mais fácil a higienização. O ideal é que nas superfícies não se formem poros nem ranhuras, e que estas sejam resistentes às deformações, como o abaulamento. As características das superfícies devem ser consideradas para a realização de um procedimento de higienização adequado.

2.1. Aço Inoxidável

Dentre os materiais disponíveis, o aço inoxidável, liga cuja composição inclui carbono, cromo e níquel, é o mais utilizado (Figura 7). Há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18 % de cromo e 8 % de níquel são os mais usados. Nesse grupo, estão as ligas da classe 300, por exemplo 304 e 316, que são resistentes à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes, além de serem facilmente higienizadas e relativamente baratas. A resistência do aço inoxidável se deve à película protetora de óxido de cromo que se forma na presença de oxigênio. Em situações em que há possibilidade de ocorrerem processos corrosivos mais intensos, como é o caso de salmouras, deve-se utilizar a classe 316, por conter mais níquel em sua composição (cerca de 10 %) e, ainda, 2 % a -3 % de molibdênio. O tipo Hastelloy, que contém 56 % de níquel, 16 % de cromo, 16 % de molibdênio, 5 % de ferro e 4 % de tungstênio, é mais resistente à corrosão, mas sua utilização é limitada em razão do alto custo.

Tabela 4 - Características de superfícies usadas no processamento de alimentos

Superfícies	Características	Cuidados
Aço inoxidável	Geralmente resistente à corrosão; superfície lisa e impermeável; resistente à oxidação, a altas temperaturas; fácil higienização.	Certas ligas podem ser corroídas por halogênios.
Aço carbono	Corroído por detergentes ácidos e alcalinos.	Deve ser galvanizado ou estanhado. Usar detergente neutro na higienização.
Estanho	Corroído por alcalinos e ácidos.	Não deve entrar em contato com alimentos.
Concreto	Danificado por alimentos ácidos e agentes de limpeza.	Deve ser denso e resistente aos ácidos.
Vidro	Liso e impermeável. Danificado por alcalinos fortes e outros agentes de limpeza.	Deve ser limpo com detergente neutro ou de média alcalinidade.
Mármore	Resistente ao calor, vulnerável a desgaste físico e reações químicas.	Deve ser limpo com detergente neutro ou de média alcalinidade.
Granito	Resistente ao calor, custo relativamente baixo podendo competir com o custo de superfícies sintéticas.	Sensibilidade aos ácidos, podendo levar à perda do brilho e modificação da coloração.
Tinta	Depende da técnica de aplicação. Danificada por agentes alcalinos fortes.	Somente algumas tintas são adequadas à indústria de alimentos. Possibilidade de adesão microbiana.
Borracha	Não deve ser porosa, não esponjosa. Não ser afetada por agentes alcalinos fortes. Não ser atacada por solventes orgânicos e ácidos fortes.	Pode ser oxidada por produtos de limpeza. Possibilidade de adesão bacteriana.
Poliuretano	Resistente a ácido, oxidação, abrasão e radiação gama.	Não resistente a agentes alcalinos; quando revestido com tecido, apresenta dificuldade de higienização e, ou, esgarçamento das fibras, favorecendo a adesão de bactérias.
Polipropileno	Resistentes a agentes químicos, como ácidos e alcalinos.	Biodegradabilidade extremamente difícil. Pode ocorrer processo de adesão microbiana.
PVC	Atóxico, impermeável, estável, bom isolante térmico e apresenta resistência à maioria dos reagentes químicos e aos agentes oxidantes.	Quando revestido com tecido, apresenta dificuldade de higienização e, ou, esgarçamento das fibras, favorecendo a adesão de bactérias.
Silicone	Grande flexibilidade, longevidade e compatibilidade com os meios de aplicação, não altera o sabor dos alimentos com os quais entra em contato.	Quando revestido com tecido, apresenta dificuldade de higienização e, ou, esgarçamento das fibras, favorecendo a adesão de bactérias.

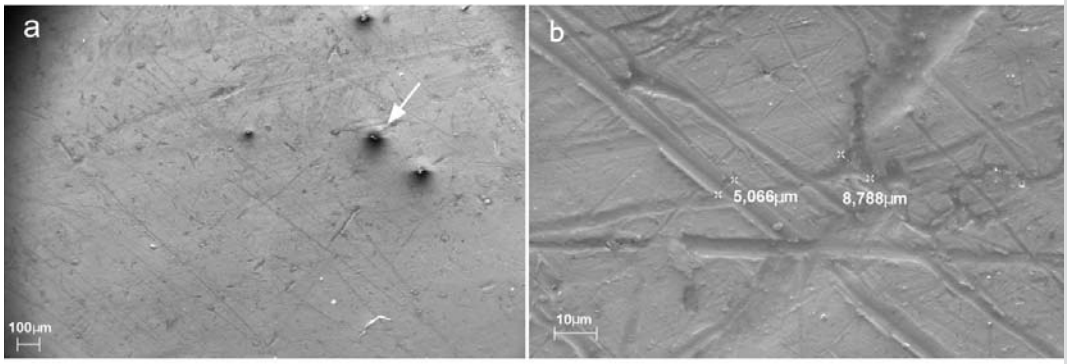


Figura 7. Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável, AISI 304 #4 por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância e b) fissuras com diâmetros variados.

O aço inoxidável difere também no acabamento da superfície, que pode variar de acordo com o polimento empregado (HAYES, 1993; LE CLERCQ-PERLAT et al., 1994; JULLIEN et al., 2002). O acabamento, ou o polimento, do aço inoxidável é importante e se classifica em escala de 0, sem polimento, até 8, cuja superfície é espelhada. Normalmente, na indústria de alimentos é utilizado o aço inoxidável com polimento 4.

Segundo Hayes (1993), os tipos de corrosão em superfícies de aço inoxidável são:

i) Pontual: qualquer lesão na camada de óxido de cromo determina a corrosão. Os resíduos alimentícios e inclusos nas partículas da superfície podem produzir corrosão por exclusão de oxigênio. No caso dos alimentos, o problema é mais grave, pois as bactérias que crescem na matéria orgânica podem produzir ácidos que são responsáveis pelo aumento da corrosão. A corrosão pontual também pode ser produzida por lesões físicas e qualquer ferrugem, mancha ou zona rugosa, que, se não tratadas, podem levar facilmente a danos mais graves. Uma das principais causas de corrosão é o emprego incorreto de soluções de limpeza e de sanitizantes, especialmente o hipoclorito de sódio. Às vezes, essas soluções são deixadas por muito tempo em contato com a superfície, são aplicadas em concentrações erradas ou preparadas com produtos inadequados.

ii) Corrosão eletrolítica: pode ser originada quando há umedecimento de dois metais distintos, como o alumínio e o ferro, ou de dois aços inoxidáveis de graus diferentes com a mesma solução. Assim, uma solução de limpeza ou de sanitização pode atuar como um eletrólito e causar corrosão quando em contato com dois metais diferentes que, por exemplo, fazem parte da mesma peça do equipamento. Os elétrons passam do ferro para o alumínio, permitindo a corrosão do alumínio.

iii) Corrosão intergranular: deve-se ao emprego de um aço inoxidável rico em carbono. Ocorre nos contornos dos grãos dos metais e, freqüentemente, propaga-se pelo interior da peça, deixando poucos sinais visíveis na superfície. Pode acontecer em lugares próximos às soldas dos equipamentos. É originada por precipitação de carbonetos de cromo nos contornos dos grãos, resultante da permanência prolongada do aço a temperaturas muito elevadas. Esse problema pode ser facilmente evitado utilizando-se aços inoxidáveis com baixo conteúdo de carbono, como o tipo 304.

iv) Corrosão geral: deve-se ao emprego de um aço inoxidável que não resiste às propriedades corrosivas do alimento processado. Pode ser evitada pelo uso de equipamento fabricado com um aço de maior grau de resistência.

2.2. Polímeros

Os polímeros são amplamente utilizados na indústria de alimentos, em razão de suas excelentes propriedades. São capazes de retardar, prevenir mudanças e deterioração no material de embalagem devido a influências externas, como presença de oxigênio, luz e microrganismos. Uma grande vantagem é o seu menor custo em relação a outros materiais usados para embalagem, por exemplo o vidro (VERGNAUD, 1998).

As propriedades dos polímeros variam bastante, dependendo da matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Basicamente, os usados na indústria de alimentos são agrupados em duas categorias: termoplásticos e termoestáveis. Os termoplásticos amolecem quando são aquecidos e endurecem quando resfriados, processo que pode ser repetido várias vezes sem mudanças químicas apreciáveis. Os tipos de termoplástico mais comumente encontrados em indústrias de alimentos são: polietileno, polipropileno, poli (cloreto de vinila) ou PVC e acrílico, entre outros. Os termoestáveis são capazes de endurecer na primeira vez que são aquecidos, mas se forem reaquecidos pode ocorrer degradação química. Poliéster, resinas epóxi e poliuretanos são polímeros termoestáveis usados na fabricação de equipamentos envolvidos no processamento de alimentos (HAYES, 1993; RODOLFO Jr. et al., 2002).

O polipropileno está entre os materiais mais populares em indústrias alimentícias, uma vez que tem sido usado em fabricação de tanques, tubulações, acessórios e superfícies envolvidas no corte de alimentos (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000). Portanto, é importante avaliar a possibilidade de contaminação cruzada de alimentos e determinar o grau de adesão bacteriana e a formação de biofilme em superfícies de polipropileno.

Algumas superfícies consideradas não convencionais têm sido usadas no processamento de alimentos. Dentre elas, destacam-se fibra de vidro, poliuretano, PVC, silicone, mármore e granito.

Os silicones são polímeros, quimicamente inertes, resistentes a ácidos e alcalinos, à radiação gama, à decomposição pelo calor, à água ou a agentes oxidantes, além de serem bons isolantes elétricos. Resistentes ao calor e a intempéries, os silicones são apresentados nas formas fluida, de resina ou de elastômeros, ou seja, borrachas sintéticas, sempre com inúmeras aplicações. Servem, por exemplo, como agentes de polimento, vedação e proteção e apresentam propriedades impermeabilizantes. Suportando temperaturas que podem variar de 65 °C negativos a 400 °C positivos, o silicone é usado em inúmeros segmentos da indústria de alimentos sem perder suas características de permeabilidade, elasticidade e brilho (RODRIGUEZ, 1989; ABIQUIM, 2004).

Superfícies de silicone possuem várias características que são responsáveis pela sua ampla aplicação, destacando-se a grande flexibilidade, longevidade e compatibilidade com os meios de aplicação. O silicone, por ser inerte e atóxico, não traz malefícios para o meio ambiente, não contamina o solo, a água e o ar, além de não alterar o sabor dos alimentos com os quais entra em contato (STEVENS, 1990, ABIQUIM, 2004).

Revestimentos de correias transportadoras de alimentos, utensílios de cozinha, máquinas automáticas de servir bebidas, moldes de confeitaria, bandejas de gelo e bicos de mamadeira são apenas algumas das inúmeras peças feitas de elastômeros de silicone para aplicações de contato com alimentos (ABIQUIM, 2004).

O PVC (Figuras 8, 9 e 10) caracteriza-se por ser atóxico, resistente à maioria dos reagentes químicos, por exemplo agentes oxidantes; impermeável; estável; e bom isolante térmico, além de possuir grande durabilidade e não propagar chamas. O PVC pode ser rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco, colorido ou não. Esse material pode ser formulado com vários tipos de aditivos, sendo o polímero mais polivalente. Esses aditivos podem melhorar as características das superfícies de PVC, como a resistência ao calor ou ao frio, a choques ou à luz, dentre outras. A adição de líquidos orgânicos, denominados plastificantes, confere ao PVC grande flexibilidade (STEVENS, 1990; RODOLFO Jr. et al., 2002; INSTITUTO DO PVC, 2004).

O PVC é o único material plástico que não é 100 % derivado do petróleo, uma vez que contém 57 % p/p de cloro, originário do cloreto de sódio, e 43 % p/p de eteno, de origem petrolífera. Dentre as superfícies de PVC envolvidas com alimentos, destacam-se embalagens usadas para acondicionamento, garrafas para água mineral, construção de tanques, tubulações, acessórios e revestimento de correias transportadoras (HAYES, 1993; INSTITUTO DO PVC, 2004).

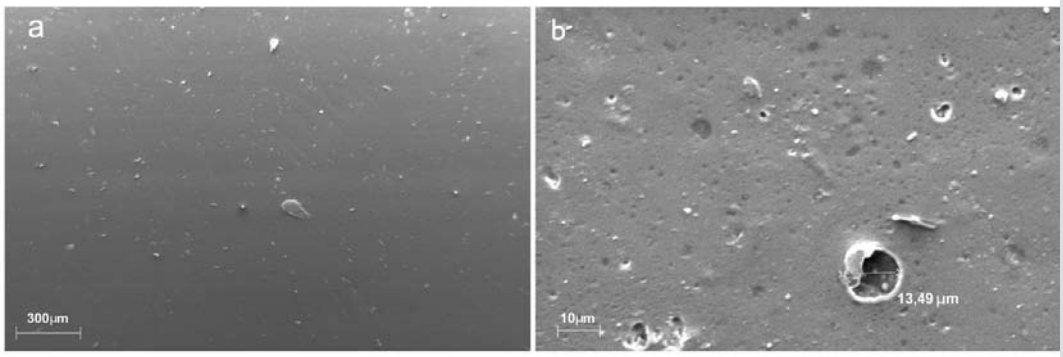


Figura 8 - Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila), o PVC, com revestimento com tecido, por microscopia eletrônica de varredura: a) poucas imperfeições e b) presença de bolhas de ar devido a defeitos de fabricação.

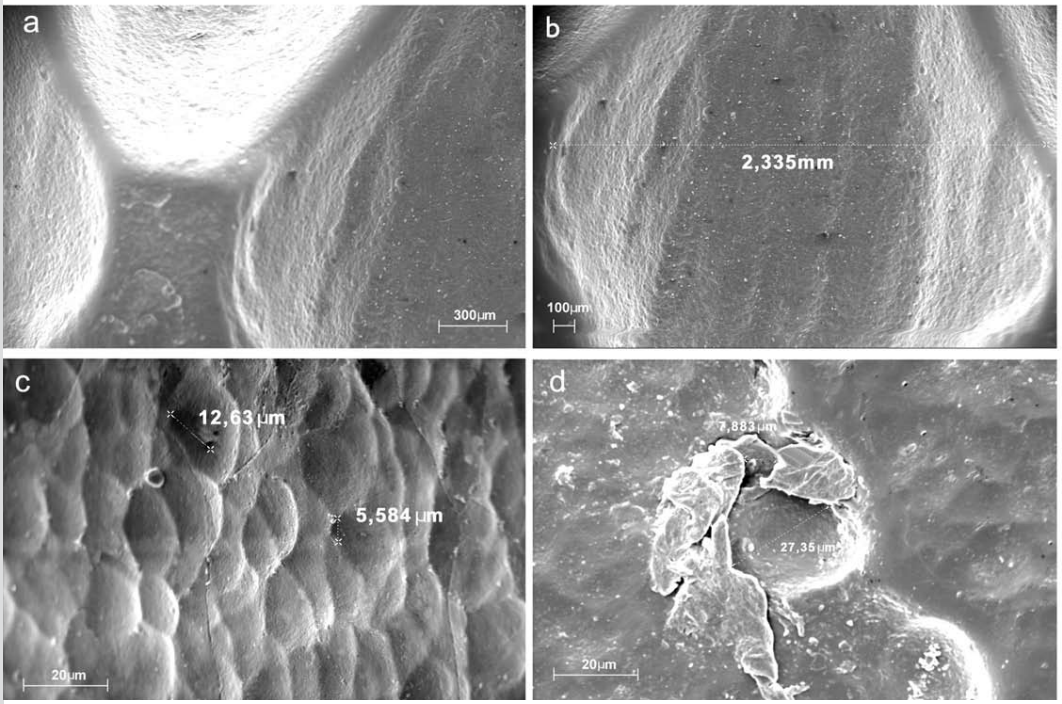


Figure 9 - Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila), o PVC, dupla face rugosa por microscopia eletrônica de varredura: a) e b) aspectos não uniformes da superfície, c) ondulações com diâmetros variados e d) depressões com diâmetros diferentes.

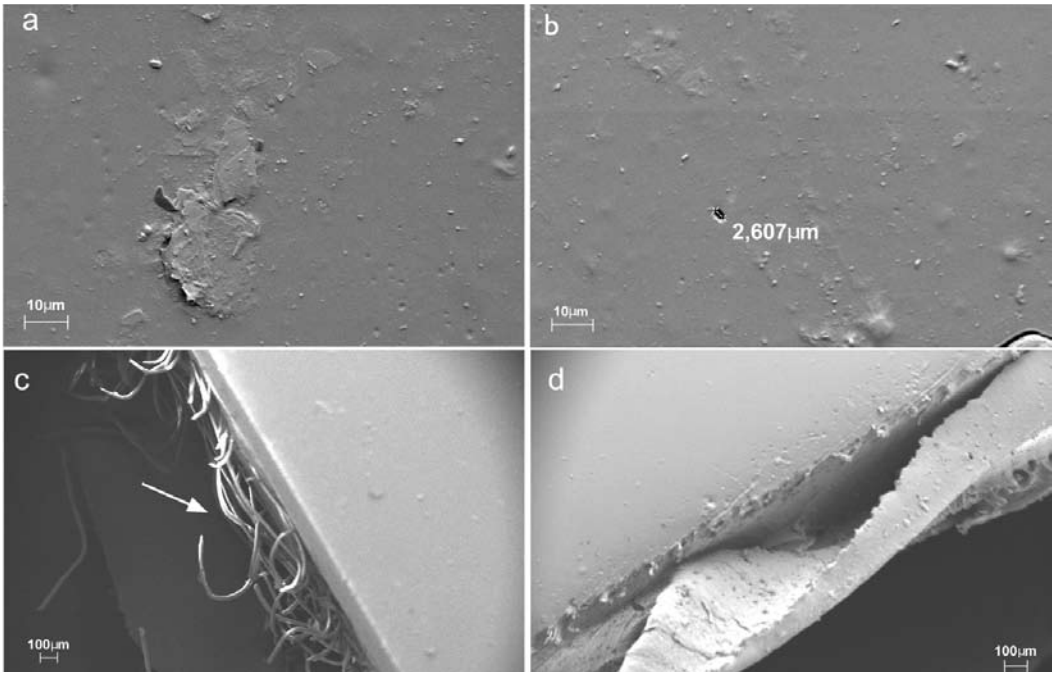


Figure 10 - Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila), o PVC, com revestimento de tecido grosso por microscopia eletrônica de varredura: a) presença de elevações, b) presença de microfuro, c) esgarçamento do tecido (seta) e d) porosidade lateral.

Os poliuretanos (Figuras 11 e 12), também conhecidos como policarbamatos, são polímeros com ampla variedade de propriedades, todas baseadas na reação de um diisocianato orgânico com componentes contendo grupos de hidróxidos, chamados de polióis (STEVENS, 1990; ABIQUIM, 2004e). Dentre as características desse tipo de superfície, destacam-se: elevada durabilidade, resistência a ácidos, à oxidação, à abrasão e à radiação gama, mas não são muito resistentes a alcalinos (RODRIGUEZ, 1989). Sólidos ou expandidos, flexíveis, semi-rígidos ou rígidos, os poliuretanos podem assumir a forma de artefatos moldados, revestimentos, elastômeros, espumas ou fibras (STEVENS, 1990). Dentre as aplicações na indústria alimentícia, destacam-se o uso em revestimentos de correias transportadoras e como isolante térmico na cadeia do frio (ABIQUIM, 2004a).

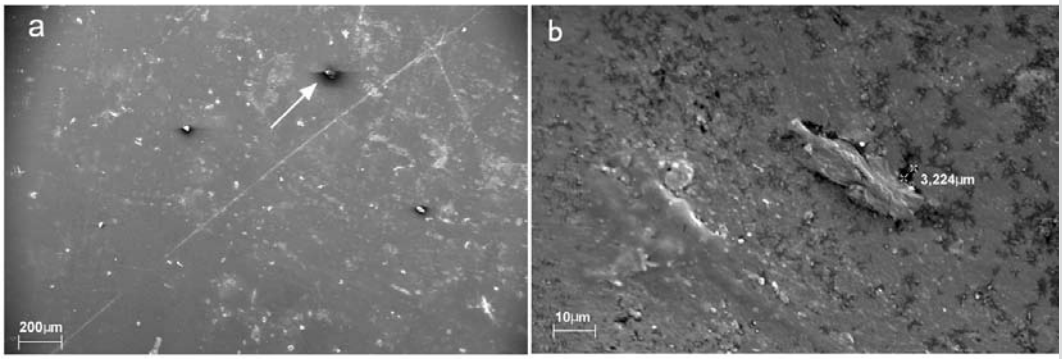


Figura 11- Fotomicrografia da superfície de poliuretano de dupla face rugosa por microscopia eletrônica de varredura: a) presença de protuberância e b) espaço irregular com diâmetro maior do que 3 μm.

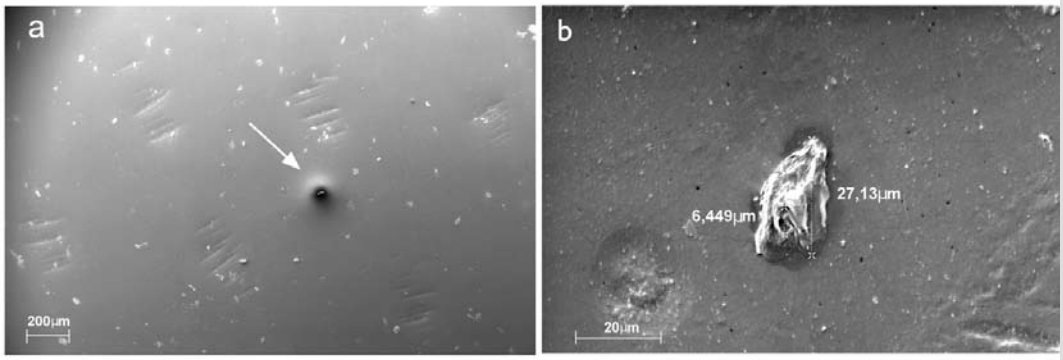


Figura 12 - Fotomicrografia de superfície de poliuretano dupla face lisa por microscopia eletrônica de varredura: a) presença de protuberâncias e b) elevação (diâmetro maior) e microfuros (diâmetro menor).

As superfícies de granito (Figura 13) correspondem às rochas ígneas e metamórficas de granulometria grossa compostas principalmente de minerais félsicos na proporção de 50 % de quartzo, 30 % de feldespato e 20 % de mica (LÓPEZ, 1970). A dureza do granito é decorrente da presença e das proporções relativas desses minerais. Esse tipo de superfície é fisicamente difícil de ser explorado e beneficiado, entretanto possui alto brilho no po-

limento e elevada durabilidade mecânica, além do mais, apresenta resistência ao calor e custo relativamente baixo, podendo competir com o custo de superfícies sintéticas. Uma desvantagem é a sensibilidade aos ácidos, podendo levar à perda do brilho e modificação da coloração, mas dificilmente haverá dissolução superficial (FRASCÁ, 2003).

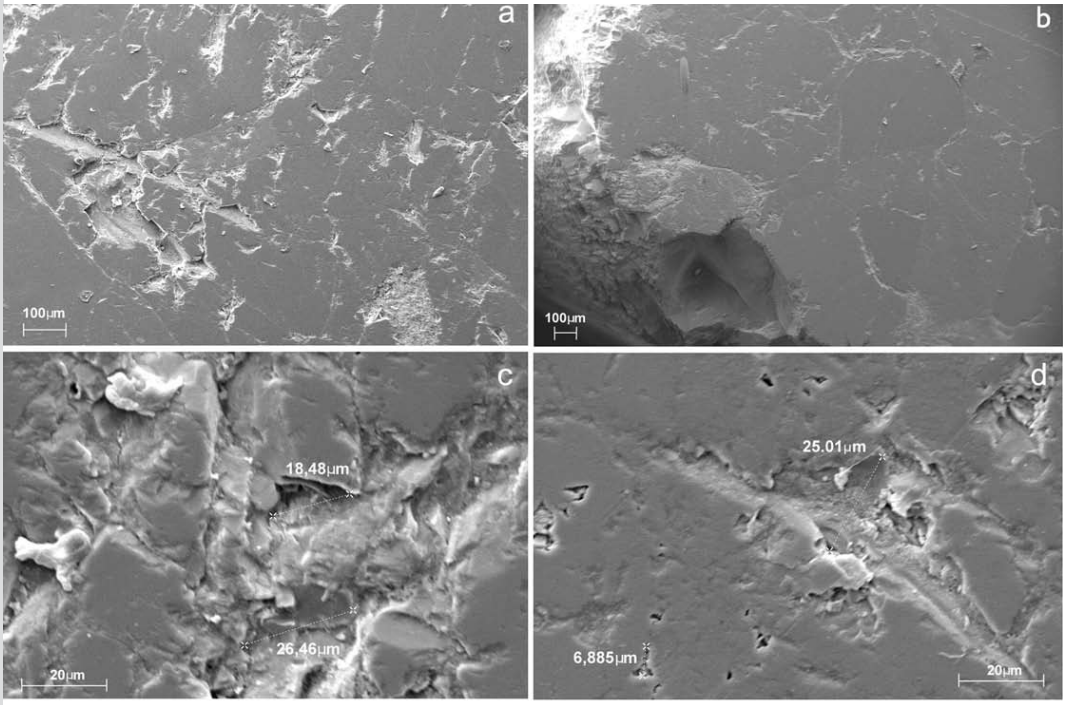


Figure 13 - Fotomicrografia de superfície de granito por microscopia eletrônica de varredura: a) presença de ranhuras e fendas, b) rugosidades (vista lateral) e c) e d) ondulações e depressões com diâmetros variados.

Cientificamente, os mármores são rochas metamórficas e recristalizadas de granulometria grossa e composição à base de carbonatos. Essas superfícies são compostas, principalmente, por carbonato de cálcio ($CaCO_3$), também conhecido como calcita, cujo conteúdo pode variar entre 90 % e 100 % de acordo com a pureza do material. Já os mármores dolomíticos são compostos por cerca de 54 % de carbonato de cálcio e 46 % de carbonato de magnésio ($MgCO_3$).

Juntamente com o carbonato de cálcio pode haver também outros minerais secundários em maior ou menor quantidade, como o óxido de silício (SiO_2), óxido de ferro (Fe_2O_3), óxido de manganês (MnO) e óxido de alumínio (Al_2O_3), entre outros, considerados impurezas. Essas várias composições são responsáveis pelas diferentes condições de durabilidade e resistência desse material, além da grande variedade de mármores no mercado (LÓPEZ, 1970).

Do ponto de vista prático, uma das principais características que determinam a qualidade dos mármores, em termos de valor, é a cor. De acordo com a coloração, os mármores podem ser classificados em brancos e coloridos. Os brancos são compostos unicamente de carbonato de cálcio, já os coloridos apresentam cores diferentes, como amarelo, verde, roxo, preto, que podem variar de acordo com os minerais de sua composição (LÓPEZ, 1970).

As superfícies dos mármores são consideradas menos compactas devido à sua dureza relativamente baixa. Por isso, são fáceis de cortar e polir, sendo adequadas para processamentos industriais. Entretanto, possuem vulnerabilidade do desgaste físico e reações químicas, com grande sensibilidade a agentes ácidos e alcalinos, o que pode acarretar o surgimento de manchas e danos na superfície (FRASCÁ, 2003).

Todas as superfícies onde se processam os alimentos são propícias à formação de biofilmes, que podem ocorrer até mesmo em locais onde as práticas de higiene são corretamente aplicadas. Desse modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (ROSSONI et al., 2000).

3. Mecanismos da Adesão Bacteriana

O entendimento dos mecanismos da adesão bacteriana às superfícies para processamento de alimentos contribui para a tomada de medidas mais adequadas ao seu controle.

As pesquisas sobre adesão bacteriana tiveram início há algumas décadas, quando se constataram que microrganismos aderidos ou em biofilmes eram responsáveis por processos de corrosão em superfícies imersas em sistemas marinhos ou aquáticos (ZOBELL; ALLEN, 1935; ZOBELL ,1943; FLETCHER, 1980; CHARACKLIS; COOKSEY, 1983; COSTERTON et al., 1987; FLETCHER, 1987).

Vários mecanismos para adesão bacteriana em diferentes superfícies de contato têm sido propostos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ZOTOLLA, 1997). De acordo com a teoria descrita por Marshall et al. (1971), a adesão em superfícies sólidas é um processo que acontece em duas etapas. A primeira é reversível, pois o microrganismo está fracamente aderido à superfície através de forças de van der Waals e atrações eletrostáticas, propiciando fácil remoção da célula bacteriana. Já a segunda é irreversível, uma vez que o tempo de aderência envolve a adesão física da célula à superfície, por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pelo microrganismo, o que se denomina matriz de glicocálix. O glicocálix auxilia a formação do biofilme, sendo produzido somente após a adesão superficial, fornecendo

condições para adesão do peptideoglicano das bactérias Gram-positivas e da parte externa da membrana externa das Gram-negativas.

Outra teoria sugere a existência de cinco etapas, diferenciadas na seguinte ordem: i) transporte de nutrientes e matéria orgânica e inorgânica para a superfície sólida; ii) formação de uma camada de nutrientes orgânicos e inorgânicos; iii) adesão dos microrganismos à superfície e crescimento celular, iv) intensa atividade metabólica no biofilme; e v) liberação de células para o meio (CHARACKLIS; COOKSEY, 1983; ZOTTOLA, 1997).

Uma terceira teoria propõe a divisão do processo de adesão em três etapas, sendo a primeira a fixação da bactéria, seguida da consolidação da bactéria na superfície e, por último, a colonização da bactéria (NOTERMANS et al., 1991).

A consolidação é um estágio importante, pois os microrganismos produzem, nessa fase, material extracelular que propicia a fixação das células na superfície. Nesse ponto, as células fixadas não são removidas por rinsagem com água (SCHWACH; ZOTTOLA, 1984; STONE; ZOTOLLA, 1985; GÓMEZ-SUAREZ et al., 2002), mas por ação mecânica ou química de detergentes e sanitizantes.

Durante o estágio de colonização, muitas mudanças provavelmente ocorrem entre a microcolônia e a superfície; e um complexo polissacarídico presente no glicocálix pode se ligar a íons metálicos, alterando a natureza química e física do biofilme. Nesse estágio, subprodutos metabólicos, como ácidos orgânicos, podem ser encontrados na matriz e resultar em corrosão local.

Vários fatores podem influenciar a adesão de microrganismos às superfícies, como as características do microrganismo; do material aderente e do meio que envolve o microrganismo (TROLLER, 1993). A espécie, o meio de cultura, a idade da cultura e a concentração do microrganismo podem afetar o processo de adesão. Quanto ao material aderente, tanto o tipo e a forma iônica quanto o tamanho da partícula são importantes no processo de adesão. No que diz respeito ao meio, fatores como pH, concentração de sais orgânicos, compostos orgânicos, agitação, tempo e temperatura de contato são importantes nesse processo (TROLLER, 1993).

A adesão bacteriana à superfície é um processo complexo que se inicia com a atração de forças eletrostáticas entre a célula e a superfície (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Na Figura 15 é apresentado um esquema em que se propõe representar a adesão bacteriana. No mecanismo de adesão bacteriana, os seguintes passos ocorrem (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987):

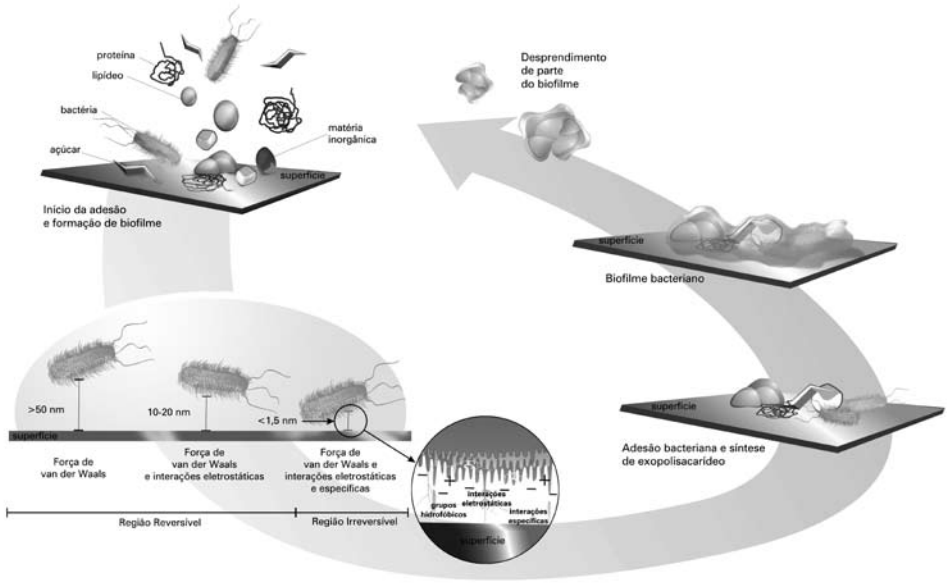


Figura 15 - Mecanismo teórico da formação de biofilmes.

i) A grandes distâncias de separação, acima de 50 nm, opera somente a força atrativa de van der Waals, sendo muito grande para a oposição de forças e o reconhecimento de componentes específicos de superfície. A aproximação é mediada por propriedades não-específicas da superfície da célula.

ii) Devido à repulsão eletrostática, a uma distância entre 10 nm e 20 nm ocorrem interações secundárias mínimas. É possível que a adesão nesse estágio seja reversível, porém se altera com o tempo para pouco reversível ou essencialmente irreversível, em razão do rearranjo da superfície da célula, levando a interações específicas de curta distância. Para isso, o filme de água precisa ser removido da interface bactéria/superfície. O maior papel da hidrofobicidade e componentes de superfície hidrofóbica na adesão bacteriana provavelmente sejam o de remoção de água nesse filme, o que auxilia a ocorrência de interações específicas de curta distância.

iii) A uma distância menor que 1,5 nm, com a barreira da energia potencial já superada, interações específicas, iguais as que se podem originar de forças polares de curta distância, podem ocorrer, e essas interações provavelmente levam a uma ligação essencialmente irreversível.

A interação específica é microscópica, como a que existe entre componentes das superfícies, ocorrendo a uma distância extremamente curta, que permite a ocorrência de ligações iônicas, de hidrogênio e possivelmente ligações químicas. A interação não-específica é definida como aquela que devido à propriedade de superfície microscópica total, como as cargas ou energia livre de superfície, pode atuar em consideráveis distâncias da superfície. É proposto um valor calculado com base na força de van der Waals, em que uma longa distância seria acima de 50 nm, enquanto a curta distância diz respeito a forças que atuam a distâncias menores que 1,5 nm (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

4. Aspectos Termodinâmicos do Processo de Adesão Bacteriana

Adesão microbiana em superfícies é uma condição indispensável na formação de biofilmes. Como referido anteriormente, inicia-se com interações de longo alcance, fracas, não-específicas entre células e superfície. Essas ligações são instáveis, podendo as bactérias ser removidas por meio de um fluido por estarem aderidas a um estágio reversível. Uma vez que as células se encontram muito próximas da superfície, podem-se formar interações de curto alcance e específicas, sendo a bactéria aderida à superfície (CHEN; ZHU, 2005). Esse processo é principalmente governado por propriedades físico-químicas dos microrganismos, como também das superfícies (OLIVEIRA et al., 2003). Estirpes bacterianas com diferentes propriedades de superfície celular mostraram diferentes cinéticas de adesão e afinidades por superfícies (BAKKER et al., 2002; CHEN; ZHU, 2005). Propriedades físico-químicas de superfícies de bactérias podem ser quimicamente modificadas para estimular ou impedir a adesão (WHITEKETTLE,1991; VAN DER MEI et al., 2001; CHEN; ZHU, 2005). Assim, estruturas extracelulares, como lipopolissacarídeos, flagelos e proteínas de membrana podem influenciar a adesão de bactérias à superfície (CAMMAROTA et al., 1998; GÓMEZ-SUÁREZ et al., 2002; CHEN; ZHU, 2005).

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para descrever e, simultaneamente, predizer a adesão bacteriana em superfícies. Em geral, a adesão pode ser ilustrada pelas teorias DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek), pela Teoria Termodinâmica da Adesão e pela Teoria DLVO Estendida.

4.1. Teoria Termodinâmica da Adesão

Nesta abordagem, a variação da energia livre de superfície interfacial de interação microrganismo e superfície é comparada antes e depois da adesão. A comparação é expressa em termos de variação de energia livre de adesão (Equação 1):

$$\Delta G^{TOT} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \qquad (1)$$

em que ΔG^{TOT} é é a variação de energia livre de Gibbs, γ_{sb} a tensão superficial entre superfície e bactéria, γ_{sl} a tensão superficial entre superfície e líquido e, por fim, γ_{bl} a tensão superficial entre bactéria e líquido (VAN OSS, 1991, 1994).

Como todo sistema na natureza, a interação microrganismo e superfície também procede em direção à diminuição da variação de energia livre, e a adesão do microrganismo ocorrerá se a variação da energia for negativa ($\Delta G^{TOT} < 0$), e a adesão será termodinamicamente desfavorável se positiva ($\Delta G^{TOT} > 0$). O cálculo das tensões superficiais é possível por meio da medida do ângulo (Figura 16) de contato (θ) das superfície ou bactéria com líquidos-padrão com energia livre conhecida (SHARMA; HANUMANTHA RAO, 2003).

O ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida (Figura 16) é o ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado. Esse ângulo permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Para realização das medidas, deve-se utilizar um líquido polar e dois apolares. Se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado a hidrofobicidade da superfície. Para Van Oss e Giese (1995), ângulos inferiores a 50° indicam superfície hidrofílica e ângulos superiores a 50°, hidrofóbica. Contudo, para Vogler (1998), uma superfície hidrofóbica deve apresentar ângulo de contato com a água superior a 65°.

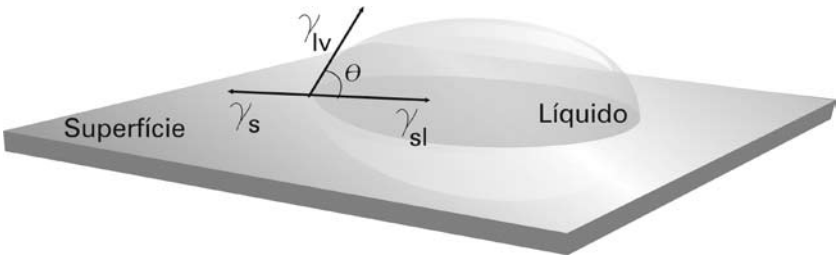


Figura 16 - Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal ilustrando as tensões superficiais da superfície do sólido, do líquido em equilíbrio com o vapor e superfície e líquido, respectivamente.

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes relaciona o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida com os componentes da tensão superficial do líquido e da superfície (Equação 2):

$$(1+\cos\theta)\,\gamma_l^{TOT} = 2\left(\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^{+}\gamma_l^{-}} + \sqrt{\gamma_s^{-}\gamma_l^{+}}\right) \qquad (2)$$

Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula e, portanto, a Equação 2 reduz-se à Equação 3:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l^{TOT}}{4}\,(1+\cos\theta)^2 \qquad (3)$$

em que γ_l^{TOT} é a tensão superficial total do líquido, γ_l^{LW} e γ_s^{LW} são as tensões superficiais das forças de interação ácido-base de Lewis, γ_l^{+} e γ_s^{+} e são as componentes aceptoras de elétrons da componente ácido-base da tensão superficial e γ_l^{-} e γ_s^{-} são as componentes doadoras de elétrons da componente ácido-base da tensão superficial, considerando-se que são as tensões para os líquidos (l) e para a superfície (s) analisados. As equações permitem determinar os componentes da tensão superficial de líquidos a 25 °C. Na Tabela 5, são mostradas as componentes da tensão superficial de líquidos (VAN DER MEI et al., 1997).

Tabela 5 - Componentes da tensão de superficial de líquidos a 25 °C

Líquido	Tensão superficial ($mJ.m^{-2}$)			
	YI^{Tot}	YI^{LW}	YI^{+}	YI^{-}
Di-iodometano	50,8	50,8	0,0	0,0
α - Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Glicerol	64,0	34,0	3,92	57,4
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6
Decano	23,8	23,8	0,0	0,0

4.2. Teoria DLVO

A clássica teoria DLVO descrita inicialmente por Derjaguin e Landau em 1941 e complementada por Verwey e Overbeek em 1948 parte da definição de que os microrganismos seriam partículas coloidais liofóbicas. Todavia, não houve consideração dos aspectos microbiológicos. Essa teoria sustenta que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz-Van der Waals e as forças de dupla camada elétrica (Equação 4).

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{EL} + \Delta G^{LW} \qquad (4)$$

em que ΔG^{EL} é a variação da energia livre das forças da dupla camada elétrica e ΔG^{LW} a variação da energia livre das forças da Lifshitz-Van der Waals (VAN OSS et al., 1990).

4.3 - Teoria DLVO Estendida

A teoria DLVO considera apenas as forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula ou microrganismo estão muito próximos (2 nm - 5 nm) de uma superfície, forças de curto alcance passam a regular o processo. Tais forças denominadas não-DLVO são representadas pelas forças de repulsão de Born, forças de hidratação, interações hidrofóbicas e pontes poliméricas.

Van Oss et al., em 1994, integraram os aspectos termodinâmicos da adesão à teoria DLVO. Essa teoria é conhecida como XDLVO ou DLVO estendida e considerou as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas. A energia livre das interações totais numa superfície (ΔG^{TOT}) é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz-Van der Waals (ΔG^{LW}), interações ácido-base de Lewis (ΔG^{AB}) e forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (ΔG^{EL}) e interações resultantes dos movimentos Brownianos (ΔG^{BR}), conforme a Equação 5 e a Tabela 6:

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{EL} + \Delta G^{BR} \qquad (5)$$

Tabela 6 - Forças envolvidas na adesão microbiana às superfícies

Tipo de interação	Força de interação	Energia de interação ($kJ.mol^{-1}$)
Reversível, de longo alcance e fraca especificidade	Van der Waals Eletrostática	20 - 50
Irreversível, curto alcance e geralmente alta especificidade	Dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, iônica, pontes de hidrogênio, hidrofobicidade	40 - 400

A intensidade das forças de Lifshitz-Van der Waals é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que se interagem e na razão inversa da distância à superfície. As forças de dupla-camada elétrica estão relacionadas à carga elétrica superficial e aos movimentos Brownianos. A superfície de um sólido eletricamente carregado em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário do meio e simultaneamente repele os de sinais iguais. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa em solução, as forças da dupla camada elétrica apresentam, geralmente, um caráter repulsivo (OLIVEIRA, 2006). Dessa maneira a adesão somente será irreversível quando a variação da energia livre de Gibbs total for negativa ($\Delta G^{TOT} < 0$) e a distância entre a superfície e o microrganismo for mínima possível.

A contribuição das interações consideradas pela teoria DLVO resulta em um perfil de energia potencial que é muito dependente da força iônica do meio (Figura 17). Assim, se a força iônica do meio é baixa, o perfil de energia potencial de interação entre os dois corpos de sinal igual apresenta um máximo de energia, que representa uma barreira para a aproximação dos corpos, e um mínimo de energia, designado mínimo primário, que se localiza a uma distância inferior a 2 nm da superfície. Quando se aumenta a força iônica do meio, a barreira de energia diminui, devido à redução da energia da dupla camada elétrica. Assim, para valores intermédios da força iônica do meio, o máximo de energia diminui, e cria-se um mínimo secundário. Este, quando os microrganismos interatuantes são bactérias, situa-se a 5 - 20 nm da superfície e pode ser tanto mais profundo quanto maiores forem as forças atrativas de Van der Waals. Uma vez ultrapassado o máximo de energia e atingido o mínimo primário, a ligação entre os dois corpos interatuantes torna-se irreversível. Para valores elevados da força iônica do meio, a energia potencial de interação é sempre negativa, e nesse caso todas as partículas podem atingir o mínimo primário. A existência de dois mínimos de energia permite distinguir entre a adesão reversível, quando ocorre no mínimo secundário, e irreversível, quando acontece no mínimo primário (CHAVES, 2004).

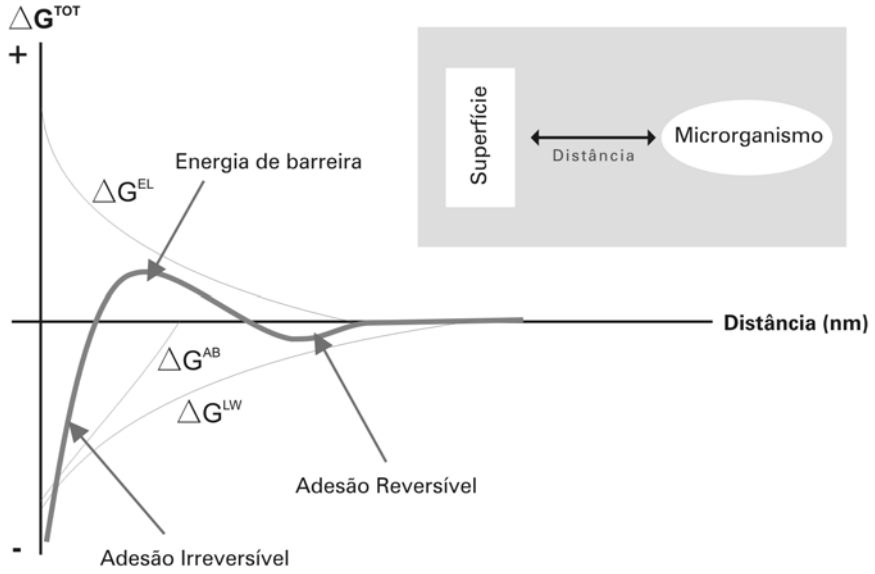


Figura 17 - Gráfico ilustrativo do processo de adesão: (ΔG^{LW}) energia livre de Lifshitz-van der Waals, (ΔG^{AB}) energia livre ácido-base de Lewis, (ΔG^{EL}) energia livre de dupla camada elétrica e ΔG^{TOT} energia livre total em função da distância (nm).

5. Fatores Associados à Adesão Microbiana e à Formação de Biofilmes

Embora os trabalhos, em sua maioria, tenham sido desenvolvidos fazendo-se simulação laboratorial, não há dúvidas de que os biofilmes se formam também em condições de processamento. Por isso, a indústria de alimentos deve estar preparada para controlar ou remover ocorrências dessas formações. Naturalmente, deve-se atuar de forma eminentemente preventiva, e, quanto a esse aspecto, os procedimentos corretos de higienização das superfícies que entram em contato com os alimentos apresentam papel relevante. Na higienização, os agentes químicos detergentes têm a função de remover resíduos orgânicos e minerais das superfícies, enquanto os sanitizantes físicos ou químicos inativam os patógenos e reduzem o número de alteradores das superfícies para números aceitáveis, por exemplo, 2 UFC.cm^{-2} de aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável, conforme recomendação da *American Public Health Association*, APHA, para que as superfícies sejam consideradas higienizadas.

A dinâmica biológica, química e física do desenvolvimento do biofilme, normalmente segue uma seqüência temporal ordenada, e o desenvolvimento do biofilme envolve as fases de adesão, crescimento celular, produção de polissacarídeos e maturação, usualmente seguida de liberação de parte do biofilme da superfície.

Nos últimos anos, muito se tem discutido sobre a diversidade de espécies e da distribuição espacial destas em biofilmes, sendo o desafio para o futuro entender a expressão de genes sobre propriedades fisiológicas e a interação entre células no biofilme (Tabela 7). O desenvolvimento rápido de ferramentas moleculares está abrindo novas alternativas para que sejam estudados com detalhes a atividade fisiológica e o estado de células individuais. Conseqüentemente, os mecanismos regulatórios serão explorados para se entender o potencial morfológico e fisiológico de uma espécie, podendo auxiliar o entendimento do que ocorre nas comunidades dos biofilmes microbianos (O'TOOLE, 1989a; O'TOOLE, 1989b; ESCHER; CHARACLIS, 1990; VAN LOBSDRECHT et al., 1990; FUQUA et al., 1996; SAUER et al., 2002).

Tabela 7 - Fatores que podem influenciar a formação de biofilmes

Genotípicos	- Genótipo específico do microrganismo - Expressão de genes que codificam propriedades de superfície - Expressão de sistemas sinalizadores - Formação de exopolissacarídeo - Dinâmica do crescimento do microrganismo; taxa de crescimento específica; fase lag; afinidade por substratos, coeficiente de rendimento - Ocorrência de flagelo, fimbria e pili na superfície - Expressão de fatores genéticos não ligados diretamente à formação de biofilmes: motilidade e quimiotaxia, catabólitos e repressão de genes, dentre outros
Físico-químicos	- Face-interface: combinações entre sólidos, líquidos e gasosos - Composição do substrato, rugosidade, hidrofobicidade, carga elétrica - Concentração do substrato/gradiente - Temperatura, pH, atividade de água, pressão, suprimento e demanda de oxigênio, efeitos da radiação
Processos estocásticos	- Colonização inicial: adesão e liberação - Potencial de biotransferência - Mudanças aleatórias em fatores bióticos e abiótico
Fenômenos determinísticos	- Interações específicas entre organismos: competição, cooperação, predação
Processos mecânicos	- Remoção devida às condições de fluxo laminar ou turbulento; abrasão; restrições logísticas
Importação ou exportação	- Adição ou remoção de componentes bióticos ou abióticos do sistema biofilme, como a entrada de detritos orgânicos no biofilme. Perda de biomassa, liberação de células individuais ou populações
Alterações temporais	- Alterações periódicas nos meios biótico e abiótico, por exemplo luz, temperatura, osmolaridade, radiação, pH, PO_2 - Alterações irregulares devido a eventos inesperados

O potencial de uma bactéria para reagir às diferenciações complexas, sempre respondendo com adaptações fisiológicas, deve ser considerado na formação do biofilme. Além disso, o papel de fatores físico-químicos na regulação da estrutura do biofilme deve ser analisado em associação com os fatores genotípicos. Nesse sentido, estudos assim em combinação com a modelagem matemática, é que buscarão uma teoria unificada, de forma a explicar melhor o ciclo de desenvolvimento do biofilme.

Alguns dos aspectos importantes que influenciam a adesão bacteriana e formação de biofilme são discutidos nos itens subseqüentes.

5.1 Apêndices Celulares

O mecanismo preciso de adesão da bactéria à superfície ainda não é bem entendido, mas sabe-se que, enquanto a bactéria não faz um contato direto com a superfície, a adesão é mediada por estruturas extracelulares capazes de sobrepor os efeitos da repulsão eletrostática. Essas estruturas se referem a pili, fímbria, exopolissacarídeos e proteínas da parede celular (DENYER et al., 1993).

Os apêndices de superfície podem servir de ligação entre a célula e o substrato de adesão, anulando a repulsão eletrostática. Esses apêndices podem variar em tamanho e rigidez, chegando a ter várias vezes a dimensão da célula. Muitos componentes de superfície da célula têm sido reconhecidos como sondas moleculares atuando estereoquimicamente com moléculas de superfície e são chamados de adesinas (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

Os apêndices contribuem para a hidrofobicidade, carga superficial e energia livre de superfície. Além disso, muitas substâncias podem estar transientemente associadas com a superfície da célula e afetar suas propriedades. Um bom exemplo é o composto ampifílico, conhecido como ácido lipoteicóico, essencialmente um constituinte da membrana citoplasmática de muitas bactérias Gram-positivas, que migram através da parede celular para o meio circundante à célula. Na superfície da célula, o ácido lipoteicóico pode atuar como uma molécula específica, por exemplo ligando *Streptococcus pyogenes* às células epiteliais e ao mesmo tempo mediando a ligação da água e do hidrocarbono na interface (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

5.1.1. Flagelo

Os flagelos são como hélices de um propulsor, apêndices rígidos e inseridos na base da célula, sendo responsáveis pela motilidade dos microrganismos (Figura 18). Esses apêndices são geralmente muito mais longos do que as células, muito finos e somente visualizados, por análise microscópica, quando são corados por compostos especiais que fazem que os seus diâmetros sejam aumentados.

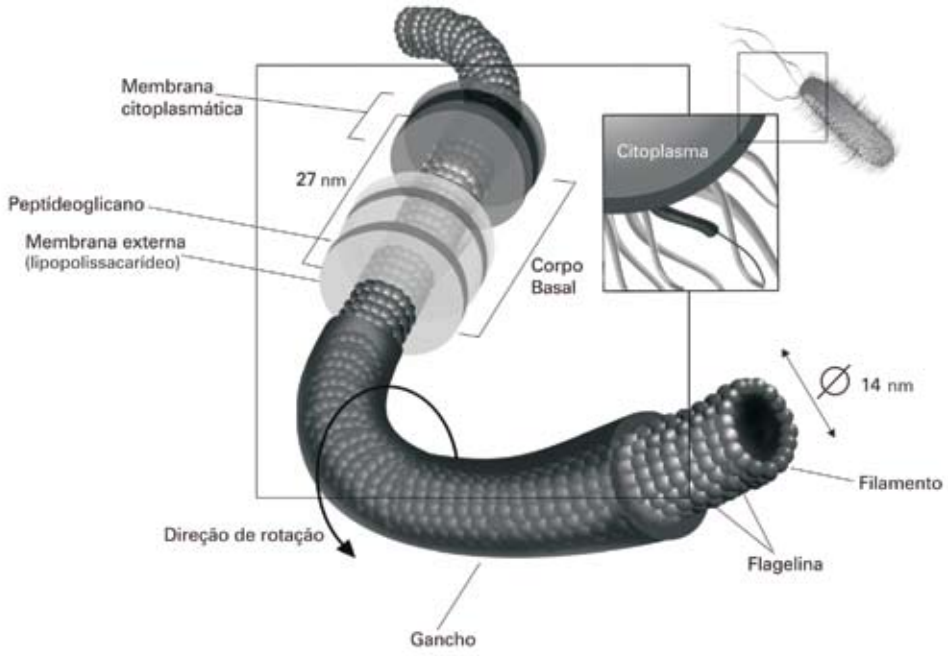


Figura 18 - Esquema de um flagelo bacteriano.

Os flagelos estão inseridos na membrana e parede celular por meio de uma estrutura denominada corpo basal, composto de dois anéis em bactérias Gram-positivas e quatro em bactérias Gram-negativas. Há uma estrutura intermediária semelhante a um cilindro tubular, em forma de gancho, como um filamento constituído de subunidades de proteína, a flagelina. As subunidades de flagelina, expostas no corpo basal e na porção filamentosa dos flagelos, podem ser posicionadas para mediar a adesão a superfícies, como as de equipamentos e utensílios usados para processar alimentos. Os flagelos são utilizados na classificação taxonômica de bactérias e se inserem de diversas formas nos microrganismos; são denominados flagelos peritríquios quando se distribuem em vários pontos em torno da célula, lofotríquio e anfilofotríquio se estiverem em grupos em uma das extremidades das células ou em ambas, respectivamente, e monotríquios quando há apenas um flagelo.

Pesquisas com espécies marinhas de *Vibrio* sugerem que durante a colonização da superfície o flagelo pode funcionar como sensor. Essas bactérias de ambientes marinhos são bacilos planctônicos de 2 μm de comprimento contendo um único flagelo polar. A adesão desse microrganismo, provocada em condições de laboratório, leva à conversão dessa célula a uma forma com mais de 30 μm de comprimento e muitos flagelos laterais. Essa alteração na morfologia da célula permite uma eficiente colonização da superfície. O flagelo polar obtém energia a partir do transporte de íon sódio, enquanto o flagelo lateral utiliza o transporte de prótons. A inibição da rotação do flagelo polar por agentes que bloqueiam os canais de sódio

resulta na produção de flagelo lateral, sugerindo que, quando as células com flagelo polar se aproximam da superfície, a rotação desse flagelo pode ser negativamente afetada. A diminuição na rotação ou no fluxo do sódio é um sinal para a produção do flagelo lateral. Assim, o flagelo polar atua como sensor (DALTON; MARCH, 1998).

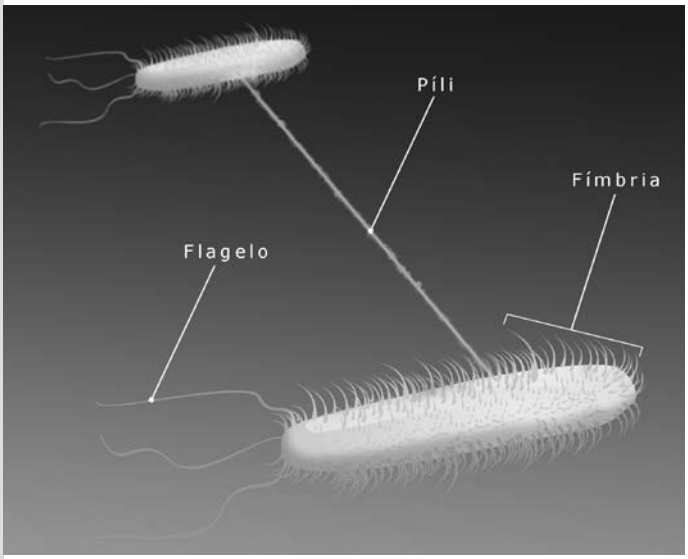


Figura 19 - Esquema de um pili, flagelo e fimbria de células bacterianas.

5.1.2. Fímbria e Pili

As fímbrias são estruturas semelhantes aos flagelos (Figura 19), porém não envolvidas com a motilidade do microrganismo, sendo menores e mais numerosas do que os flagelos. Apresentam estrutura filamentosa, composta de subunidades de proteína, denominada pilina. São encontradas em uma variedade de superfícies de células, como de *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae*, entre outras. O papel da fímbria na adesão bacteriana por células patogênicas tem sido bastante estudado. A interação entre a bactéria e o hospedeiro, ou uma superfície inerte, depende da proteína existente no corpo ou na ponta da fímbria. A fímbria se liga a receptores específicos no hospedeiro e ativa os genes hospedeiro-célula, com a tradução da sinalização, levando a aumento na adesão ou invasão (AUSTIN et al.,1988; DALTON; MARCH, 1998).

Os *pilus* (Figura 19) são estruturas similares às fímbrias, sendo, em geral, mais longas, e somente um ou poucos deles estão presentes nas superfícies dos microrganismos. Esses apêndices podem ser visualizados por meio da microscopia eletrônica, porque servem de receptor específico de vírus e, quando recobertos por esses microrganismos, podem ser facilmente observados. Também envolvidos em processos de adesão microbiana (BROCK et al., 1994; DI MARTINO et al., 2003), os *pilus* geralmente são constituídos por monômeros de uma única proteína, denominada pilina, que, quando reunidos, apresentam estrutura tubular de 3 a 25 nm de espessura e 0,2 a 20 μm de comprimento.

Mutantes de *E. coli* que não apresentaram capacidade para produzir *pili* do tipo I, ou flagelo, não formaram biofilmes em PVC, havendo poucas células aderidas em pequenos grupos. Pode-se dizer, portanto, que a mobilidade é importante para sobrepor a força de repulsão entre a bactéria e o substrato, e, uma vez atingida a superfície, o *pili* do tipo I é requerido para estabilizar a adesão (STICKLER, 1999).

Estudos com mutantes de *P. aeruginosa* que eram incapazes de formar biofilme em PVC mostraram que essas estirpes apresentavam defeito no *pili* do tipo IV ou flagelo mediador da motilidade. Estirpes selvagens desse microrganismo formaram uma monocamada de células em superfície após quatro horas. Entre cinco e oito horas, as monocamadas tornaram-se confluentes, fazendo que toda a superfície ficasse coberta. Os mutantes sem motilidade falharam em aderir ao PVC em um período de oito horas. Mutantes com defeito no *pili* do tipo IV formaram monocamadas dispersas, porém falharam em adensá-las. A retração e extensão no *pili* do tipo IV são consideradas as causas da migração das células através da superfície, que é chamada de "*twitching*". No caso de *P. aeruginosa*, parece que a motilidade mediada pelo flagelo é importante para a adesão e formação de monocamadas dispersas de células (STICKLER, 1999).

Com base em estudos, pode-se assegurar que o *pili* de *Salmonela* Enteritidis também está envolvido no processo de iniciação de biofilme em aço inoxidável e teflon. Mutantes sem capacidade de produzir uma fímbria agregativa, chamada de SEF 17, foram incapazes de formar biofilmes espessos típicos de estirpes selvagens. Assegura-se ainda que essa fímbria estabiliza o contato célula-célula durante a formação do biofilme (STICKLER, 1999).

5.1.3. Proteínas da Superfície Celular

Componentes macromoleculares da superfície da bactéria parecem interagir com os do filme condicionante (MARSHALL, 1992). Estudos demonstraram que células de *Vibrio* DW1, devido à falta de nutrientes (estarvadas), quando aderidas passam a metabolizar moléculas orgânicas como ácidos graxos e proteínas, iniciando o crescimento e atingindo o tamanho normal (Figura 20), quando, então, começam a se multiplicar. Essas células aderem a uma posição perpendicular. A célula-mãe permanece aderida, enquanto a célula-filha é liberada, tornando-se planctônica (MARSHALL, 1992).

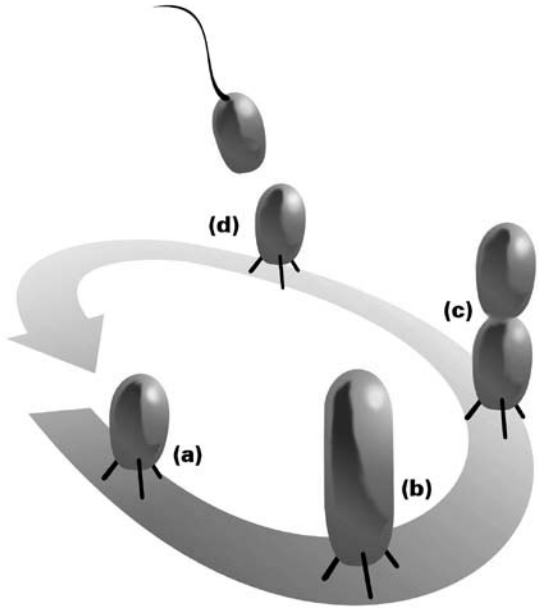


Figura 20 - Ciclos repetidos de adesão e reprodução de *Vibrio* marinho DW1: (a) adesão de pequena célula estarvada, (b) crescimento celular na superfície do substrato, (c) duplicação e (d) liberação.

Outras bactérias aderem de forma a se colocarem no mesmo plano da superfície e se dividem formando

colônias ou as células-filha, que podem ser lentamente liberadas para o meio. Supõe-se que algumas bactérias sejam liberadas para o meio, devido a alterações da superfície da célula ou das propriedades da superfície (MARSHALL, 1992).

Espécies do gênero *Streptococcus* expressam um conjunto de componentes de superfície importantes para a adesão da célula no hospedeiro. Essa adesão pode ter dois estágios: um inicialmente reversível e o outro irreversível. Há evidências de que a fase reversível envolve interações hidrofóbicas entre a célula hospedeira e o ácido lipoteicóico da parede celular bacteriana. Observações adicionais indicaram que a proteína M, uma adesina, de *Streptococcus* spp. é requerida para a adesão irreversível. Esse modelo é provavelmente análogo ao que acontece quando a bactéria coloniza superfícies inertes. Uma importante classe de adesina liga-se especificamente aos componentes da matriz extracelular, particularmente fibronectina (Fn), o maior componente dessa matriz. Alguns trabalhos têm enfocado o papel da Fn em adesão bacteriana e mostraram que *Campylobacter jejuni* expressa uma proteína da membrana externa (37 kDa) que se liga a Fn (DALTON; MARCH, 1998).

Staphylococcus aureus expressa duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam à fibronectina, chamadas de *fnb*PA e *fnb*PB. Mutantes de *S. aureus* que não possuíam o gene *fnb*A ou *fnb*B não foram deficientes na adesão, porém o duplo mutante para *fnb*A e *fnb*B foi completamente deficiente. Se um dos dois tipos de genes é fornecido por meio de plasmídeos, a adesão é restaurada (DALTON; MARCH, 1998).

Experimentos com mutantes de *Pseudomonas fluorescens* que apresentavam deficiência na capacidade de adesão em superfície mostraram que alguns desses mutantes eram imóveis, enquanto outros eram incapazes de produzir uma proteína denominada ClpP, normalmente encontrada na superfície da célula. O crescimento em citrato, glutamato ou meio minimamente suplementado com ferro, embora não tenha restaurado a motilidade, recuperou a capacidade da célula de iniciar a formação do biofilme. Fenômeno semelhante foi observado com mutantes ClpP. Propôs-se que *Pseudomonas fluorescens* pode utilizar múltiplas estratégias para a iniciação da adesão e que essas são dependentes de sinais do meio ambiente percebidos pelos microrganismos.

5.2. Estrutura e Condições Ambientais do Biofilme

A estrutura do biofilme pode variar de acordo com a localização, a natureza dos organismos constituintes e a disponibilidade de nutrientes, apresentando-se em finas ou espessas camadas. Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, em que o fluxo de nutrientes foi constante, colonizaram a superfície de maneira a obter uma forma semelhante à de cogumelos, em que canais de água interligavam as microcolônias, como um primitivo sistema circulatório, distribuindo nutrientes e removendo resíduos das microcolônias (STICKLER, 1999).

Uma questão importante é como as células de *Pseudomonas aeruginosa* se comunicam e coordenam sua sobrevivência na construção do biofilme. Em bactérias Gram-negativas, a comunicação celular pode ser feita por meio de homosserina lactonas aciladas (AHLs). Essas pequenas moléculas sinalizantes são excretadas por células e se acumulam em culturas em razão da densidade celular. As AHLs podem interagir com os receptores na superfície da célula bacteriana que controlam a expressão de genes, o que pode resultar no controle de densidade local de células. O processo da comunicação entre as células e a coordenação da densidade celular denomina-se *quorum sensing*. Experimentos com mutantes de *P. aeruginosa*, incapazes de produzir as AHLs, demonstraram que eles produzem uma fina camada de células na superfície do vidro, e a adição de AHL ao meio permitiu a restauração da habilidade do mutante para produzir biofilmes do tipo selvagem. Observou-se também que os mutantes em biofilmes não desenvolviam resistência ao tensoativo biocida dodecil sulfato de sódio, que era característico do biofilme do tipo selvagem. Concluise que o acúmulo de AHLs durante o desenvolvimento do biofilme é responsável pela transformação de células individuais planctônicas em células sésseis. Essas substâncias coordenam a formação de estruturas complexas de comunidades multicelulares (STICKLER, 1999).

Determinadas proteínas têm importante papel na adesão microbiana. Albuminas, fibrinogênio e pepsina, por exemplo, inibem a adesão de espécies do gênero *Pseudomonas* ao poliestireno, enquanto a caseína favorece o processo de adesão. De acordo com os estudos, a albumina demonstrou ser pouco favorável à adesão de *Listeria monocytogenes* em sílica (KUMAR; ANAND, 1998).

Denyer et al. (1993) sugeriram que, na maioria dos casos, a bactéria aderida demonstra aumento na atividade metabólica, porém somente quando em baixo nível de nutrientes. Outros estudos mostraram que o crescimento de *Escherichia coli* foi melhorado depois da adsorção em superfície, mas apenas quando a concentração de nutriente (glicose) foi menor que 25 $mg.L^{-1}$. A adesão na superfície pode oferecer vantagem à célula para efetuar a captura e, ou, entrada de nutrientes escassos no meio. Outros autores também confirmaram um aumento na atividade metabólica para bactérias associadas à superfície em baixa concentração de nutrientes ou até mesmo em concentração zero.

O pH e a temperatura têm influência no grau de adesão do microrganismo. *Pseudomonas fragi* mostrou máxima adesão ao aço inoxidável, em pH na faixa de 7 a 8, que são ótimos para o seu metabolismo. Outros estudos mostraram que Yersinia enterocolítica adere melhor ao aço inoxidável a 21 °C do que a 35 °C ou 10 °C, e que a 35 °C as células observadas não possuíam flagelo, o que sugere que essa estrutura auxilia o processo de adesão. Quanto ao pH, *Yersinia enterocolitica* parece aderir melhor em pH entre 8,0 e 9,5 do que em pH 6,0, nas temperaturas de 10 °C, 21 °C e 35 °C. Em pH 6,0, poucos flagelos foram observados, o que pode ter influenciado negativamente a adesão (HERALD; ZOTTOLA, 1988).

Estudos realizados por Stone e Zottola (1985) indicaram que, na adesão em aço inoxidável em fluxo contínuo de leite, *Pseudomonas fragi* produziu fímbria em 30 minutos a 25 °C e dentro de duas horas a 4 °C. A adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável foi maior em pH ótimo para o metabolismo da célula, e presume-se que essa adesão tenha ocorrido em razão do transporte ativo de cátions para a superfície, aumentando sua carga superficial (ZOTTOLA, 1994).

5.3. Hidrofobicidade, Carga Elétrica e Rugosidade das Superfícies

Acredita-se que as interações hidrofóbicas tenham papel relevante na aderência de organismos patogênicos e não-patogênicos a tecidos vivos e que mecanismos similares podem ser responsáveis pela adesão a substratos inanimados. Interações hidrofóbicas são induzidas por moléculas de água situadas no meio de solutos não-polares (DENYER et al., 1993). As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam carga elétrica negativa em pH neutro. Embora os mecanismos não sejam completamente entendidos, esses fatores físico-químicos têm importante papel no processo de adesão microbiana (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, em razão do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultura. No quimiostato, por exemplo, quando a taxa de crescimento da cultura aumenta, a hidrofobicidade diminui (KUMAR; ANAND, 1998).

Em relação à carga de superfície, pode-se dizer que tanto a bactéria quanto o substrato adquirem carga, que geralmente é negativa, em virtude da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície, podendo, então, atrair íons contrários que estão na fase aquosa circundante. Assim, quando a bactéria aproxima da superfície do substrato, ocorre o início do desenvolvimento de interações resultantes da atmosfera iônica, que circunda as duas superfícies. A intensidade dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e constante dielétrica do meio circundante e depende, ainda, da distância entre a bactéria e o substrato (DENYER et al., 1993).

O estudo da adesão da bactéria à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas das duas superfícies - bactéria e substrato - e da interação entre elas. Em geral, ambas as superfícies possuem carga global negativa, e para que ocorra a adesão é necessário que a barreira de repulsão eletrostática seja superada pela força atrativa (DENYER et al., 1993).

Ligações moleculares específicas operam somente a curtas distâncias, envolvendo três ligações: iônicas, de hidrogênio e químicas. As cargas de superfície têm influência na adesão. Microrganismos, assim como algumas superfícies biológicas nas quais eles se aderem, freqüentemente têm potencial zeta negativo sob condições fisiológicas. As cargas negativas surgem principalmente de grupos fosfatos e carboxílicos, podendo ser uniformemente distribuídas com cargas positivas dos grupos amino (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

O eventual resultado da interação entre essas forças é determinado por princípios termodinâmicos. O encurtamento da distância entre o substrato e a bactéria faz que as forças adesivas comecem a predominar, o que é favorecido pela presença de apêndices e polímeros extracelulares (DENYER et al., 1993)

Segundo Characklis e Cooksey(1983), adsorção reversível resulta principalmente de interação de forças a longas distâncias, enquanto adesão irreversível é geralmente considerada resultado de interações mais definitivas. Essas últimas interações, na maioria das vezes, contam com o encurtamento da distância entre as forças físicas de atração e são otimizadas pela interação dos grupos componentes da célula-receptora de ligação (DENYER et al., 1993).

A Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, aprova o "Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos", definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com essa Portaria, todo o equipamento e o utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que: I) não libere substâncias tóxicas, odores e sabores; II) seja não absorvente e resistente à corrosão; e III) seja capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção.

As superfícies devem ser lisas e estarem isentas de rugosidade e frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos. Não é recomendável o uso de madeira e de outros materiais que não possam ser limpos e desinfetados adequadamente, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será uma fonte de contaminação. Deve ser evitado o uso de diferentes materiais na mesma superfície, para inibir o aparecimento de corrosão por contato (BRASIL,1997).

As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado (HAYES, 1993). Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície (rugosidade), podendo apresentar fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar microrganismos, principalmente bactérias (Figura 21). A ocorrência dessas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização, favorecendo o crescimento microbiano e o desenvolvimento de microrganismos (BOWER et al., 1996). A rugosidade dos materiais também influencia a formação do biofilme (TAYLOR; HOLAH, 1996), mas parece ser menos importante em relação à adesão inicial (BOULANGE-PETERMANN et al., 1998). Esse fato pode ser relacionado à superfície de contato entre microrganismos e superfícies que processa o alimento. Em geral, quanto maior a superfície de contato, maior a probabilidade de formação de biofilme, uma vez que maior é a força inicial de adesão. Contudo, nem sempre quanto maior a rugosidade maior a adesão inicial. A influência da rugosidade da superfície no processo

de formação de biofilme é relacionada às dificuldades durante a higienização de superfícies rugosas. Equipamentos processadores de alimentos são fontes potenciais de microrganismos patogênicos (MIDELET; CARPENTIER, 2004). Haeghebaert et al. (2002) mostraram que a contaminação de equipamentos contribuiu com 59 % de surtos de doenças de origem alimentar investigadas na França, durante o ano de 2001. Conseqüentemente, é importante melhorar o conhecimento dos fatores envolvidos na transferência de microrganismos de equipamentos para os alimentos, especialmente durante o contato.

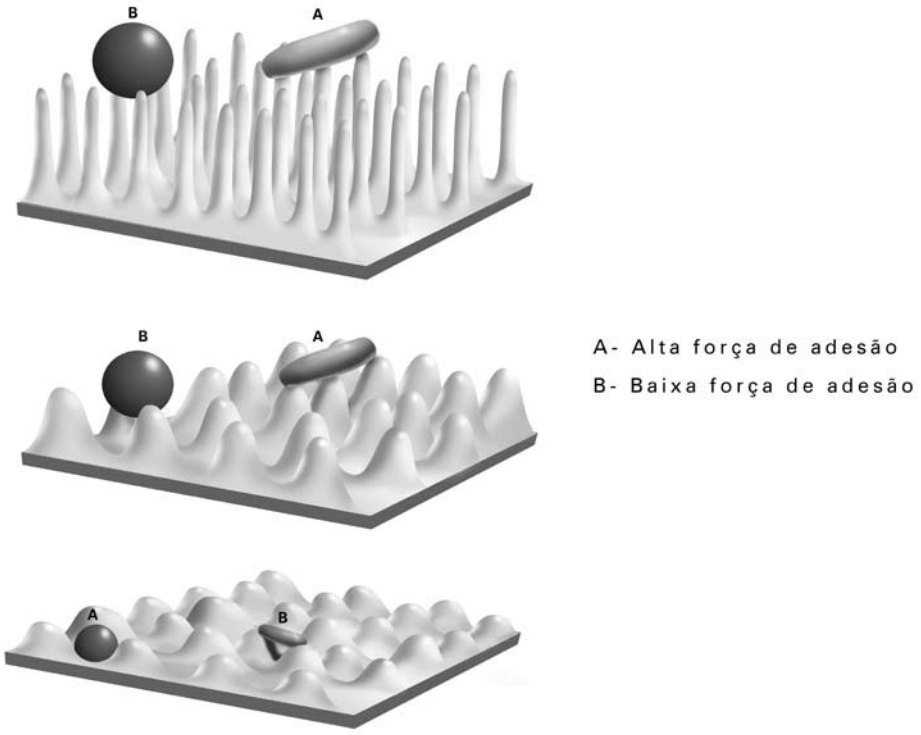


Figura 21 - Adesão microbiana: tamanho do microrganismo x rugosidade.

Alguns parâmetros na análise da rugosidade são analisados sendo os mais importantes: (i) R_a, a média aritmética do valor absoluto das distâncias da linha média ao perfil R dentro da latitude da amostra. A unidade desse parâmetro é o micrômetro; (ii) R_q, o valor médio da raiz quadrada dos desvios do perfil em relação à linha média, dentro da longitude da amostra. Esse parâmetro apresenta um significado estatístico, o desvio-padrão das alturas do perfil, sendo considerado mais sensível que R_a; (iii) R_z é o valor absoluto dos cinco picos mais altos mais o valor médio absoluto dos cinco vales mais profundos, dentro da latitude da amostra. Também apresenta a unidade em micrômetros (OLIVEIRA, 2006).

5.4. Formação de Exopolissacarídeo

A matriz extracelular tem conteúdo elevado de substâncias poliméricas extracelulares que variam de 50 % a 90 %. Já a terminologia para o material extracelular associado com os agregados de células ou biofilmes varia de acordo com a literatura, sendo referido como limosidade, cápsula, glicocálix, substância polimérica extracelular e substâncias cimentantes extracelulares (Figura 22).

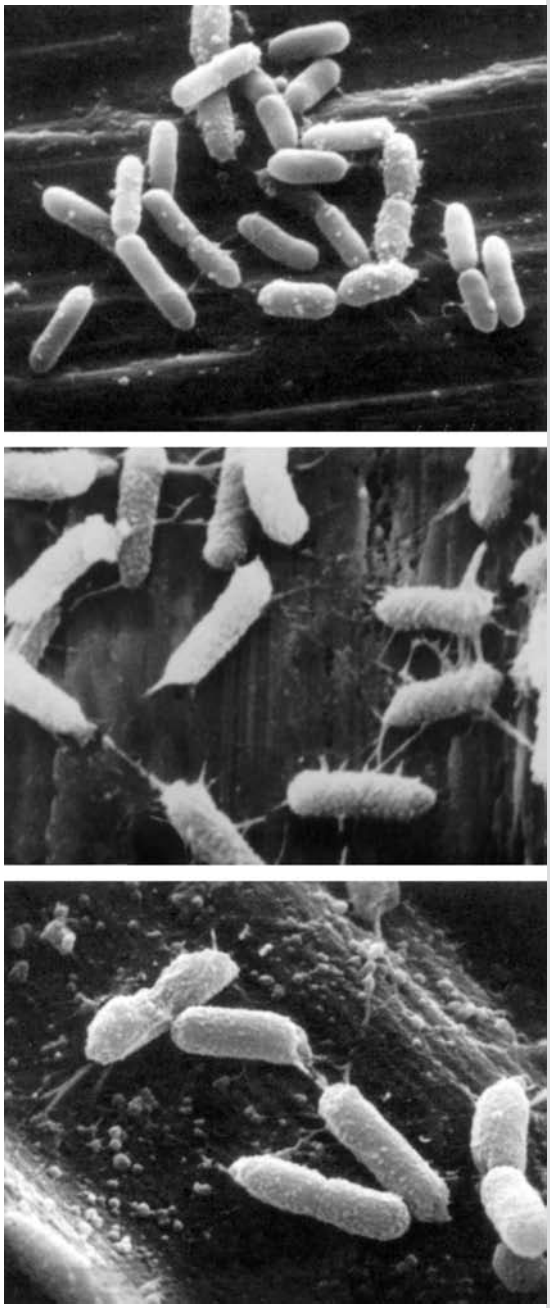


Figura 22 - Estágios de formação de biofilmes observados por microscopia eletrônica de varredura (Fonte: ZOLTAI et al, 1981; HERALD; ZOTTOLA, 1988).

O último estágio da adesão da célula à superfície, chamado de adesão irreversível, envolve interações específicas e está associado à produção de exopolissacarídeos (Tabela 8). Há cerca de 40 anos foi demonstrado o envolvimento de polissacarídeos ácidos na adesão bacteriana (DENYER et al., 1993). Açúcares como glucose, galactose, manose, frutose, ramnose, N-acetilglicosamina, ácido glucorônico, ácido galacturônico e ácido gulurônico são típicos constituintes do polissacarídeo bacteriano (DENYER et al., 1993).

De acordo com pesquisas, vários polissacarídeos e fosfolipídeos acumulam-se mais tarde na fase estacionária, quando a célula se encontra sob estresse fisiológico. Pesquisadores têm observado a produção de diferentes polissacarídeos durante o crescimento exponencial e a fase estacionária. Pesquisadores induziram a inanição de células em crescimento exponencial, observando que foi liberado um polissacarídeo viscoso e solúvel, enquanto o mesmo polissacarídeo não foi produzido por células que estavam em crescimento. Verifica-se, portanto, que a inanição produz diferentes polímeros (DENYER et al., 1993).

Tabela 8 - Informações sobre substâncias poliméricas extracelulares participantes de processo de adesão

Denominações	Limosidade, cápsula, glicocálix, substância polimérica extracelular e substâncias cimentantes extracelulares
Composição	
Açúcares	Glucose, galactose, manose, frutose, ramnose, N-acetilglicosamina, ácido glucorônico, ácido galacturônico e ácido gulurônico
Proteínas	Eventualmente, polipetídios
Influenciam a difusividade, condutividade térmica e propriedades reológicas	Diminuem a difusão de antibióticos e sanitizantes. Transferem cerca de 27 vezes menos calor que o aço inoxidável. Podem ser mais ou menos espessas/ viscosas, dependendo do estado fisiológico do microrganismo que a produz. Atuam como uma armadilha para biocidas carregados eletricamente
Conteúdo em água	Entre 98% e 99%
Principal componente da matriz extracelular	Cerca de 50% a 90%

Alguns pesquisadores observaram menor produção de polissacarídeos por bactérias sob inanição do que em culturas em crescimento. Quando o meio de crescimento é rico, a bactéria pode produzir polímeros à taxa elevada, porém liberando-os como limosidade e não os retendo como cápsula. Anticorpos produzidos em culturas líquidas reagiram com a matriz do biofilme *in situ*, o que indica que substância polimérica extracelular do biofilme contém alguns polímeros semelhantes aos produzidos no líquido de cultura pelos organismos. Em um estudo foi mostrado que o mesmo microrganismo produz mais substâncias poliméricas extracelulares no biofilme do que em suspensão em cultura (DENYER et al., 1993).

As substâncias poliméricas extracelulares influenciam as propriedades físicas do biofilme, incluindo difusividade, condutividade térmica e propriedades reológicas. Devido à densidade de cargas e ao estado iônico do exopolissacarídeo, pode se formar uma barreira à difusão, fazendo-o agir como uma peneira molecular. Em razão da natureza altamente hidratada e predominantemente polianiônica do exopolissacarídeo, também podem atuar como uma matriz trocadora de íons, contribuindo para o aumento da concentração local de substâncias iônicas, como metais pesados, amônia e potássio, entre outros, que têm efeito oposto aos dos grupos aniônicos. Isso pode não ter efeito sobre nutrientes carregados, incluindo açúcares, contudo pode servir como armadilha para nutrientes catiônicos como aminas, especialmente sob condições oligotróficas (COSTERTON, 1981). A penetração de moléculas carregadas, como alguns biocidas, pode ser, em parte, reduzida por esse fenômeno.

Alguns polímeros componentes do biofilme podem reduzir muito a sensibilidade do microrganismo a uma série de antibióticos; contudo, Nichols et al. (1989) sugerem que somente a adsorção e a diminuição da difusão causada pelo exopolissacarídeo não podem, isoladamente, explicar a resistência da bactéria a antibióticos. Tornam-se necessários mais trabalhos para que se possa entender a diminuição na sensibilidade aos antibióticos pelas células em biofilmes. Characklis et al. (1981) reportaram que a condutividade térmica de um biofilme em cultura mista é similar à da água e, portanto, concluíram que o biofilme fornece cerca de 27 vezes mais resistência à transferência de calor do que o aço inoxidável de igual espessura. Dessa maneira, um biofilme bastante fino pode restringir a transferência de calor através de um tubo de aço inoxidável (DENYER et al., 1993).

Assanta et al. (1998), ao investigarem a adesão de *Aeromonas hydrophila* em sistema de distribuição de água, observaram que o microrganismo aderiu facilmente em todos os tipos de superfície avaliados, ou seja, aço inoxidável, cobre e polibutileno, após um tempo de exposição tão curto quanto 1-4 horas, nas temperaturas de 4 °C e 20 °C. O polibutileno, com energia de superfície de 42,2 $mJ.m^{-2}$, foi mais colonizado do que o aço inoxidável, com 65,7 $mJ.m^{-2}$ de energia de ativação. Poucas células aderidas foram observadas em superfície de cobre, apesar de sua baixa energia de superfície de 45,8 $mJ.m^{-2}$. De acordo com estes autores, isso pode ser devido a um efeito antimicrobiano do íon cobre, afetando a habilidade de a bactéria aderir e multiplicar-se nessa superfície.

O contato direto entre bactéria e substrato pode ser estabelecido, em nível molecular, por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas bactérias. Em virtude de essas substâncias não estarem sujeitas ao mesmo tipo de repulsão das bactérias, podem-se estabelecer ligações entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas, como eletrostática, co-valente e de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo e interações hidrofóbicas; conseqüentemente, o mesmo tipo de bactéria pode aderir em diferentes graus (MARSHALL, 1992).

A cápsula de muitas bactérias é composta por polissacarídeos, embora algumas espécies do gênero *Bacillus* possam formar cápsula de polipeptídio. A presença de cápsula pode aumentar a adesão microbiana e atuar como defesa contra a fagocitose. Esse material pode também facilitar a adsorção de agentes tóxicos, prevenindo, assim, sua penetração no citoplasma (BOWER et al., 1996).

Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras

tornam-se mais grossas com o passar do tempo, o que leva à formação da matriz do biofilme, e, dentro dessa matriz, outras substâncias orgânicas, inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com microrganismos. A produção de exopolissacarídeos é aumentada com a adesão da bactéria à superfície e, caso as células do biofilme sejam reinoculadas no meio, como células planctônicas, haverá menor produção de exopolissacarídeos (KUMAR; ANAND, 1998).

Segundo Costerton et al. (1978), o glicocálix integra a membrana externa de Gram-negativas e do peptideoglicano de células Gram-positivas, sendo composto de diversas fibras de polissacarídeos ou proteínas globulares; em seu estado hidratado, contém entre 98 % - 99 % de água. *Pseudomonas aeruginosa* forma alginato como maior constituinte do glicocálix e é importante para o desenvolvimento de biofilmes com uma só espécie. Os exopolissacarídeos produzidos pelos microrganismos têm importante papel, que é o de proteger a célula da desidratação, já que pode reter água em quantidade várias vezes maior que sua massa e se desidrata lentamente. Em *Pseudomonas aeruginosa*, a presença de ácido urônico acetilado no alginato bacteriano aumenta a capacidade de hidratação.

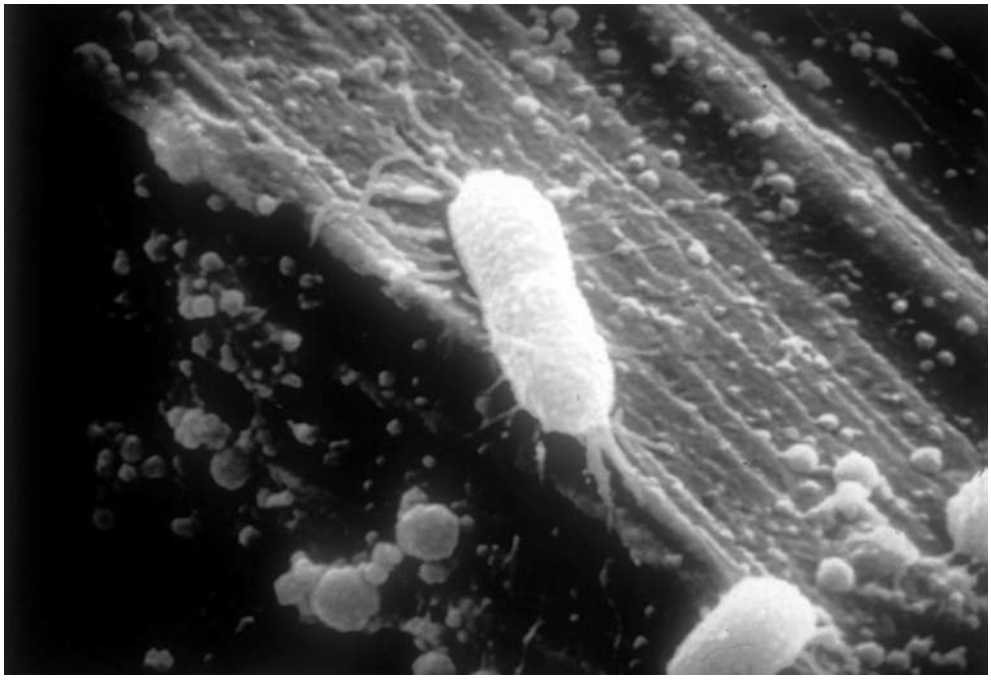


Figura 23 - Bactéria aderida ao aço inoxidavel, mostrando a presença de exopolisacarídeo. (Fonte: ZOTTOLA, 1999)

6. Composição dos Biofilmes Microbianos

As porcentagens de componentes orgânicos e inorgânicos no biofilme podem ser determinadas pela combustão (Tabela 9). Os sólidos voláteis e fixos refletem a fração orgânica e inorgânica, respectivamente. A fração volátil de uma população microbiana planctônica é maior que 90 % e para biofilmes esse valor é consideravelmente menor, uma vez que existe uma massa de constituintes inorgânicos aprisionados ou precipitados dentro da matriz do biofilme. Contudo, em experimentos laboratoriais, em que predominam os componentes bióticos, a fração volátil do biofilme pode chegar a 80 % do seu peso seco. A relação carbono/nitrogênio é cerca de cinco vezes maior em alguns biofilmes do que em células microbianas em razão provavelmente, da grande quantidade de polímeros extracelulares que, geralmente, têm pequena quantidade de nitrogênio (DENYER et al., 1993).

Tabela 9 - Composição química do biofilme avaliada após a combustão

Fração volátil no biofilme	É de cerca de 80% e na população microbiana planctônica, de 90%
Relação carbono/nitrogênio	É cinco vezes maior, quando comparada com a população microbiana planctônica
Anaerobiose	Na base do biofilme, predomina a anaerobiose, favorável ao crescimento de bactérias sulfato-redudoras, responsáveis por processos corrosivos em metais

A fração inorgânica é maior em biofilmes que estão em ecossistemas aquáticos naturais, onde a argila, a areia e os sedimentos penetram na matriz, influenciando a sua propriedade física (DENYER et al., 1993).

A presença do biofilme pode favorecer a corrosão do metal, principalmente a ocasionada pela aeração diferencial que as células sofrem em virtude da distribuição irregular do biofilme ou, ainda, pela formação de sítios de anaerobiose na base, devido à respiração microbiana. Isso oferece condições favoráveis para o crescimento de bactérias sulfato-redutoras que usam o hidrogênio, gerado em meio ambiente anaeróbio pela combinação de prótons e elétrons, que por sua vez aumentam a corrosão do metal. As bactérias sulfato-redutoras também produzem metabólitos corrosivos, como os sulfitos, que levam à incorporação de produtos de corrosão, como o sulfito de ferro dentro da matriz do biofilme (DENYER et al., 1993).

Referências

ABIQUIM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. Atividades Setoriais: Silicones. Disponível em: <http:www.abiquim.org.br/setorial/ silicones/asp>. Acesso em: 29 set. 2004a.

ABIQUIM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. Poliuretanos. Disponível em: <http: www.abiquim.org.br/canais.asp?id=13>. Acesso em: 29 set. 2004b.

AKUTSU, C. K. Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistências a sanificantes químicos em condições de uso simulado. Viçosa, MG. UFV, 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALLISON, D. G.; McBAIN, A. J.; GILBERT, P. Biofilms: problems of control. In: Community Structure and Co-operation in Biofilms, Proceedings of the 59th. Simposium of the Society for General Microbiology, Exeter,UK. eds GILBERT, P., LAPPIN-SCOTT, M., WILSON, M. Cambridge, UK. p. 309-328. University Press,2000.

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, n.28, p.145-155, 1995.

ANDRADE, N. J., AJAO, D.B., ZOTTOLA, E.A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, n.11, v.61, p.1454-1458, 1998a.

ANDRADE, N. J., BRIDEGMAN, T.A., ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faeciuum* attached to atainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, p.833-838, 1998b.

ARCURI, E.F. Biofilme bacterianos na indústria de alimentos, **Revista Leite e Derivados** v.9, n.53, 2000.

ASSANTA, M.A., ROY, D., MONTPETIT, D. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system pipes after different contact times. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1321-1329, 1998.

ANTUNES, M. A. **Sistema multimídia de apoio à decisão em procedimentos de higiene em unidades de alimentação e nutrição**. Editora UFV, Viçosa, MG, 2003 (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV). 78p.

AUSTIN, J.W., BERGERSON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*, v.62, p.509-519, 1995.

AUSTIN, J.W., SANDERS, G., KAY, W.W., COLLINSON, S.K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbial Letters**, n.162, p.295-301, 1998.

BAKKER. D.P., BUSSCHER, H.J., VAN DER MEI, H.C. Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber: microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. **Microbiology**, v. 148, p. 597-603, 2002.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state of the art methods of study. **International Biodeterioration and Biodegradation**. V. 53, p. 177-183, 2004.

BEECH, I. B., GAYLARDE, C. C. Adhesion of Desulfovibrio desulfuricans and Pseudomonas fluorescens to mild steel surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p.201-207, 1989.

BEER, D., SRINIVASAM, R., STEWART, S. Direct measurement of chorine penetration into biofilm during desinfection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4339-4344, 1994.

BERESFORD, M. R., ANDREW, P. W., SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p.1000-1005, 2001.

BOULANGE-PETERMANN, L. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, v. 5, p.21-36, 1991.

BOULANGE-PETERMANN, L., RAULT, J. BELLON-FONTAINE, M. N. Adhesion of *Streptococcus thermophillus* to stainless s steel with different surface topography and roughness. **Biofouling**, v. 11, p. 201-216, 1998.

BOWER, C.K., Mc GUIRE, J., DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.152-157, 1996.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7ed. New Jersey: Prentice Hall, 1994. 909p.

BUSSCHER, H.J., WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substract. **FEMS Microbiology**, v.46, p.165-173, 1987.

CAMMAROTA, M. C., SANT' ANNA, G. L. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. **Biotechnology**. **Letters**, v. 20, p. 1-4, 1998.

CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, v.75, p.499-511, 1993.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/**diseaseinfo/foodborneinfectionst**.htm, Acesso em 28 de novembro de 2006.

CHARACKLIS, W.G., COOKSEY, K.E. Biofilm and microbial fouling. **Adv. Applied Microbiology**, v.29, p.93-137, 1983.

CHAVES, L.C.D. Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável. Minho, Braga: Universidade de Minho. 2004, 186p. Dissertação (Mestre em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, 2004.

CHEN, G., ZHU, H. Bacterial adhesion to silica sand as related to Gibbs energy variations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, p. 41–48, 2005.

COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotrophic microrganisms. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.1, p.157-160, 1981.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Rev. Microbiol.**, v.41, p.435-464, 1987.

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G., CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, v.238, p.86-89, 1978.

COSTERTON, J.W., LAPPIN-SCOTT, H.M. Behavior of bacteria in biofilms. **ASM News**, v.55, n.12, p.650-654, 1989.

CRIADO, M.T., SUÁREZ, B., FERREIRÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food Technology**, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

CZECHOWSKI, M. H. Gasket and stainless steel surface sanitation: environmental parameters affecting bacterial attachment. **Austr. Journal of Dairy Technology**, p. 38-39, 1990.

DALTON, H.M., MARCH, P.E. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.252-255, 1998.

DENYER, S. P., GORMAN, S. P., SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control.** Londres: Blackwell Scientific Publications, 1993. 333 p.

DESROSIER, J.P., LARA, J.C. Isolation and properties of pili from spores of *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v.145, n.1, p.613-619, 1981.

DI MARTINO, P, CAFFERINI, N., JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 9-16, 2003.

DOYLE, M.P. A new generation of foodborne pathogens. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.12, n.8, p.490-493, 1992.

ESCHER, A., CHARACKILIS, W. G. Modeling the initial events in biofilm accumulation. In: CHARACKLIS, W. G. and MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York, 1990. p. 445-486.

FAPEMIG/FUDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Intoxicação alimentar. Minas faz ciência, n.11, Disponível em <**http:/revista.fapemig.br/11intoxicação.html**>acesso em:janeiro 2003

FIGUEIREDO, H. M.. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de linha de processamento de leite. Imprensa Universitária**, UFV, 2000. (Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV). 80 p.

FLETCHER, M. Adherence of microorganisms to smooth surfaces. In: BEACHEY, E.H. (Ed.) **Bacterial adherence.** New York: Chapman and Hall, 1980. p.78-97.

FLETCHER, M. How do bacteria attach to solid surfaces? **Microbiology of the Science**, v.4, p.133-136, 1987.

FLINT, S., PALMER, J., BLOEMEN, K., BROOKS, J., CRAWFORD, R. The growth of *Bacillus stearothermophylus* on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 151-157, 2001.

FLINT, S.H., BREMER, P.J., BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant - Description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v.11, n.1, p.81-87, 1997.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Tradução Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Consultoria, supervisão e revisão técnica: Eduardo César Tondo. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 151-154.

FUQUA, C., WINNANS, S.C., GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annual Rev. Microbiol.**, n.50, p.727-751. 1996.

FRASCÁ, M. H..B. **Mármores e granitos: uso e conservação.** Disponível em: <http:/www.ipt.br/tecnologia/chat/?ARQ=110> acesso 05dez.2004

GOMEZ-SUAREZ, C., PASMA, J., VAN DER BORDEN, A. J., WINGENDER, J., FLEMMING, H. C., BUSSCHER, H. J., VAN DER MEI, H. C. Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. **Microbiology**, v. 148, p.1161-1169, 2002.

HAEGHEBAERT, S., LE QUERREC, F., BOUVET, P., GALLAY, A., ESPIÉ, E. VAILLANT, V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France. **Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire**, v. 50, p. 249-253, 2002.

HAMMER, P.; LEMBKE, F.; SUHEREN, G; HEESCHEN, A. Characterization of a heat resistant mesophilic Bacillus species affecting quality of UHT milk- a preliminary report. **MILCHWISTSCHAFTLICHE**, V.47, P.303-311, 1995

HAYES, P. R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Tradução Bernabé Sanz Pérez. Zaragoza : Acribia, 1993. p.187-196.

HERALD, P. J., ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures an pH values. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 6, p. 445-448, 1988.

HJELM, M., HILBERT, L. R., MOLLER, P., GRAM, L. Comparison of adhesion of the food spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens* to stainless steel and silver surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92. p. 903-911, 2002.

HOLAH, J. T., THORPE, R. H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused an abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 599-608, 1990.

HOOD, S. K. **Adherence of foodborne microrganisms to stainless steel**. Ph.D Thesis. University of Minnesota, St Paul, p.129, 1996.

HOOD, S., ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 8-18, 1995.

INSTITUTO DO PVC. O PVC. Disponível em: < **http://www.institutodopvc.org/ pvc.htm**>. Acesso em: 29 set. 2004.

KLIJN, N.;HERMAN, L.; LANGEVELD, L.; VAEREWIJCK, M.; WAGENDORP, A .A .; HUEMER, I.; WEERKAMP, A. H. Genotypical . characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains surviving UHT sterilization. **International Dairy Journal**, v.7,p.421-428, 1997

KUMAR, C. G., ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.77-87, 2002.

LARSEN, H. D. e JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in danish pasteurized milk.. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.

LE CLERCQ-PERLAT, M. N., LALANDE, M. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. **Journal of Food Engineering**, v. 23, p. 501-517, 1994.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 179-184, 2003.

LEREBOUR, G. CUPFERMAN, S. BELLON-FONTAINE, M. N. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 7-16, 2004.

LÓPEZ, E. S. **Piedras, granitos y marmoles.** 7 ed. Barcelona:CEAC,1970. 200p.

MAFU, A.A., ROY, D., GOULET, J., MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, v.53, n.9, p.742-746, 1990.

MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. American Society of Microbiology News, v.58, p.202-207, 1992.

MARSHALL, K.C., STOUT, R., MITCHELL, R.. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v.68, p.337-348, 1971.

MIDELET, G., CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 262-270, 2004.

MOSTELLER, T.M., BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

NORTEMANS, S., DORMANS, J. A. M. A., MEAD, G. C. Contribuition of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, v. 5, p. 21-36, 1991.

OLIVEIRA, K. M. P. **Adesão de *Salmonella Enteritidis* em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. Londrina, P: UEL, 2006. 115p. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 2006.

OLIVEIRA, R., AZEREDO, J., TEIXEIRA, P. The importance of physicochemical properties in biofilm formation and activity. **Biofilms in wastewater treatment**. 2003.

O'TOOLE, G. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review**. **Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2000.

O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, n.30, p.295-305, 1998a.

O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, n.28, p.449-461, 1998b.

PALMER, J. **Hygienic milk production and equipment cleaning.** New Zeland: Fermoy: Moorepark Research Centre, 1998. 47p.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N.F.F.; SILVA, C.A..B. MONTEIRO, E.A.M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p.77-83, 2004

PETTERSSON , B.; LEMBKE, F. HAMMER, P.; STACKEBRANDT, E.; PRIEST, G. *Bacillus sporothermodurans*, a new specie producing highly heat-resistant endospore. **J. Systematic Bacteriolgy**, v.46, n.3, p759-764,1996

POMPERMAYER, D. M. C., GAYLARDE, C., C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, p. 361-365, 2000.

RODOLFO Jr., A., NUNES, L. R., ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC.** São Paulo: Proeditores/Braskem, 2002.400 p.

RODRIGUEZ, F. **Principles of polymer systems.** 3rd ed. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1989. p. 602-603.

RONNER, U., HUSMARK, U., HENRIKSSON, A. Adhesion of *Bacillus spores* in relation to hydrophobicity. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, p.550-556, 1990.

ROSSONI, E. M. M., GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p 81-85, 2000.

SAMSONOFF, W.A., HASHIMOTO, T., CONTI, S.F. Ultrastructural changes associated with germination and outgrowth of an appendage-bearing Clostridial spore. **Journal of Bacteriology,** v.101, n.3, p.1038-1045, 1970.

SAND. W. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates – a general mechanistic overview. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 40, p. 183-190, 1997.

SASAHARA, K.C., ZOTTOLA, E.A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microrganism in flowing systems. **Journal Food Protection**, v.56, n.12, p.1022-1028, 1993.

SHARMA, P.K., HANUMANTHA RAO, K. Adhesion of Paenibacillus polymyxa on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.29, p. 21-38, 2003.

SAUER, K. CAMPER, A.K.; ERLICH, G.D. COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as biofilm. **Journal of Bacteriology**, v.184, p1140-1153, 2002

SCHWACH, T.S., ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopy study on some effects of sodium hipoclorite on attachment of bacteria to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v.47, n.10, p.756-759, 1984.

SCKOKEN-ITURRINO, R.P.; NADER, F.; DIMENTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros Bacillus e Clostridium em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, v.102, n.42.p.25-27, 1996

TE GIFFEL, M. C,; BEUNER, RR.; VAN DAM, W.F. SLAGHUIS, B.; ROUMBTS F.M. Sporicidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment. **International Biodegradation**; p.412-230, 1995

SNYDER, JR, O.P. Control of surface microorganisms and biofilms. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.12, n.7, p.525-529, 1992.

STEVENS, M. P. **Polymer Chemistry: an introduction**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 440-492.

STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v.2, p.270-275, 1999.

STONE, L. S., ZOTTOLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 951-956, 1985.

TAKAZAKI, M., SUDO, R. NISHIMURA, O., KIM, H.Y. Simultaneous removal of nitrogen and THM precursors by developed submerged biofilm process for drinking water. Wat. Sei. Tech., v.26, n.9, p.2021-2024, 1992.

TAYLOR, J. H., HOLAH, J. T. A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81, p. 262-266, 1996.

TROLLER, J.A. **Sanitation in food processing**. 2th edition, New York: Academic Press, 1993. p.52-69.

VAN DER MEI, H.C., VAN DE BELT-GRITTER, B., DOYLE, R.J., BUSSCHER, H.J. Cell Surface Analysis and Adhesion of Chemically Modified Streptococci. **Journal of Colloid and Interface Science**, n°. 2, v. 241, p. 327-332, 2001.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M., LYKLEMA, J., NORDE, W., ZEHNDER, A. J. B. Influences of interfaces on microbial activity. **Microbiology**, v. 54, p.75-87, 1990.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F.; COSTANZO, P.M. DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. Clays Clay Minerals, v. 38, p. 151-159, 1990.

VAN OSS, C. J. **Interfacial forces in aqueous media**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994.

VAN OSS, C.J. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles-their determination and relatives roles. Biofouling, v. 4, p. 25-35, 1991.

VAN OSS, C. J., GIESE, R. F. The hidrophilicity and hidrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VERGNAUD,J.M. Problems encoutered for food safety with polymer packages: chemical exchange, recycling. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.78, n.3, p.267-297, 1998.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WHITEKETTLE, W.K., Effects of surface-active chemicals on microbial adhesion. **Journal of Industrial Microbiology,** v. 7, p.105-116, 1991.

ZACARCHENCO, O. B., LEITÃO, M.F.F. Avaliação e otimização da metodologia para contagem de Bacillus sporothermodurans. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, n.309,p134-150, 1999

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v.46, p.39-56, 1943.

ZOBELL, C.E., ALLEN, E.C. Attachment of marine bacteria to submerged surfaces. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.30, p.1409-1411, 1935.

ZOLTAI, P.T., ZOTTOLA, E.A., MCKAY, L.L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v.44, n.3, p.204-208, 1981.

ZOTTOLA, E. A . Special techniques for studying microbial biofims in food system. In: Tortorello, M. L. & Gendel, S. M. **Food microbial analysis – new technologies. IFT basic simposium series.** Marcell Dekker, INC. Cap. 16 p. 315-3346, 1997.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

Capítulo 02

Técnicas em Microscopia Usadas no Estudo da Adesão e da Formação de Biofilmes Microbianos

1. Introdução

2. Microscopia Óptica de Luz

2.1. Tipos de Microscopias de Luz e suas Aplicações

2.2. Microscopia Eletrônica

3. Aplicação da Microscopia no Estudo da Adesão e Formação de Biofilme

3.1. Microscopia de Força Atômica

3.2. Uso da Microscopia de Força Atômica na Avaliação de Adesão de Microrganismos e Análise de Rugosidade de Superfícies

3.3. Adesão Bacteriana em Diferentes Superfícies Avaliada pela Microscopia de Epifluorescência.

3.4. Adesão Bacteriana e Formação de Biofilmes Observada pela Microscopia Eletrônica de Varredura

3.5. Avaliação de Superfície de Aço Inoxidável por MFA

4. Conclusão

5. Referências

Cláudia Alencar Vanetti
Gino Ceotto
Eduardo Alves
Nélio José de Andrade

1. Introdução

No nível atual da pesquisa pós-genômica, o próximo desafio da pesquisa é a compreensão da interação das macromoléculas em células vivas, embora, em países em desenvolvimento, como o Brasil, muito estudo ainda tenha de ser feito sobre níveis básicos de conhecimento de organismos próprios das regiões tropicais. Atualmente, com a comprovada mudança climática que está ocorrendo em todo o globo, os problemas típicos de países tropicais, antes restritos ao hemisfério sul, deverão se estender à parte do hemisfério norte, atingindo países ou parte de países antes de clima temperado. Portanto, onde predominavam invernos rigorosos, cujo clima controlava naturalmente a entrada de população de patógenos típicos do hemisfério sul, a partir de agora terão também de se preocupar com contaminantes dessas regiões de invernos amenos.

Em outros capítulos deste livro, discorre-se sobre a contaminação microbiana na indústria alimentar, com ênfase na adesão de células, formação de biofilmes, propagação de bactérias e seu controle, dentre outros. Neste capítulo, faz-se uma síntese sobre o uso da microscopia, tanto óptica de luz (= microscopia de luz) quanto eletrônica e de força atômica, como mais uma ferramenta importante nos estudos básicos de contaminação bacteriana na indústria alimentícia e no diagnóstico e na avaliação de testes metabólicos, químicos, bioquímicos, biofísicos, físicos e de controle. Serão feitos comentários sobre algumas características exclusivas e importantes que diferenciam microscópios ópticos de luz (microscópios de luz), microscópios eletrônicos de varredura (MEV) e de transmissão (MET), microscópio óptico de varredura a laser (Confocal), microscópio de força atômica (MFA), sondas de raios-X e a interação entre alguns deles, dando-se ênfase aos possíveis usos de cada um, com a finalidade de ajudar aos estudantes e pesquisadores na decisão sobre qual(is) o(s) aparelho(s) mais indicado(s) para o desenvolvimento de seu trabalho.

É preciso sempre se ter em mente que a escolha do tipo de microscópio a ser empregado está unicamente relacionada com o objetivo que se quer alcançar, ou seja, todos os tipos de microscópios ou sondas são igualmente importantes, e a sua escolha depende apenas das características deles e do apurado ajuste da metodologia necessária para alcançar determinado fim. Em biologia, é preciso saber de antemão se o estudo é apenas morfológico ou diagnóstico, se histológico ou celular ou de localização de moléculas bioquímicas ou minerais, ou de interação entre moléculas. Por exemplo, não é funcional realizar uma pesquisa investigativa de um órgão completo usando-se, de início, um microscópio eletrônico de transmissão ou, ao contrário, usar um microscópio de luz de campo claro ou uma lupa com o objetivo de localizar exatamente certa macromolécula em determinada or-

ganela celular. Entretanto, os passos a serem dados devem, de preferência, seguir um ordenamento natural do macro para o milimétrico e, daí, para o micrométrico e nanométrico. Evidentemente que, se já se dispõe de informações a respeito de determinado assunto, podem-se queimar etapas.

As siglas MEV, MET e MFA referem-se tanto ao microscópio quanto à microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e de força atômica, conforme o contexto da frase.

2. Microscopia Óptica de Luz

Com o advento dos microscópios no século XVII, o limite de resolução do olho humano, que é de 0,1 milímetro, aproximadamente, foi estendido para 0,1 a 0,2 micrômetro, com o desenvolvimento de lentes de vidro usadas em microscópios de luz convencional.

O microscópio óptico de luz, agora denominado microscópio de luz ou microscopia de luz, é um sistema óptico capaz de fornecer uma imagem ampliada de um objeto, permitindo a observação de detalhes invisíveis a olho nu. É constituído basicamente por dois conjuntos de lentes: o conjunto objetiva e o conjunto ocular. A objetiva dá uma imagem real ampliada e invertida do objeto; a ocular, por sua vez, fornece uma imagem virtual que, através do cristalino, se projeta na retina do globo ocular e é interpretada pelo cérebro.

Na microscopia de luz, o componente mais crítico é a objetiva. É nela que se forma a imagem inicial, assim como é ela que determina a resolução do microscópio, sendo a principal responsável pela capacidade de aumento do objeto.

A capacidade de aumento de uma lente de vidro depende da sua capacidade ou limite de resolução. O limite de resolução (*LR*) de uma lente, ou de um microscópio, por sua vez, é medido como a capacidade da lente de resolver a menor distância entre dois pontos. Ele é calculado pela fórmula $LR = k \times \lambda / AN$, portanto o limite de resolução é diretamente proporcional ao comprimento de onda do espectro visível usado (λ, que varia da luz azul = 488 nm à luz vermelha λ = 640 nm) multiplicado por um fator (*k*) de 0,61 e inversamente proporcional à abertura numérica (*AN*). Conseqüentemente, pela fórmula podemos concluir que, usando filtro para comprimento de onda azul e uma objetiva com (*AN*) de 1,4, o microscópio estará apto a separar dois pontos com 0,5 micrômetro de distância entre eles. No outro extremo, com a mesma objetiva usando filtro de luz vermelha, a resolução do aparelho cairia para 0,7 micrômetro, ou seja, o microscópio não poderia resolver distâncias menores que 0,7 micrômetro entre dois pontos, fornecendo como imagem final apenas um ponto.

A *AN* de uma lente é fornecida pelo fabricante, e ela se refere ao ângulo de captação dos feixes luminosos que passam através da lente condensadora, depois pela lente objetiva. Ou seja, uma lente objetiva com capacidade de aumento de 100 x e que trabalha imersa em óleo possui maior *AN* do que uma lente de 10 x, porque trabalha mais próxima à lente condensadora. Uma boa objetiva também varia com o tipo de material do qual a lente é fabricada e com os tipos de aberrações luminosas corrigidas, ou seja, lentes com correções para aberração cromática, aberração esférica, como astigmatismo, curvatura do campo (HIBBS, 2004). A melhor lente de aumento de 100 x é a Plan-Apochromatic (Zeiss) usada em imersão em óleo, que possui *AN* de 1,40. No lugar do óleo, podem-se usar outros líquidos como meio contínuo de ligação entre a amostra e a objetiva, como água e glicerina. Entretanto, um bom óleo é aquele que possui o índice de refração semelhante ao do vidro da lamínula, praticamente não causando desvio por refração entre a lamínula e a objetiva. Existem objetivas apropriadas para o uso com água como líquido de imersão da lente.

O nome das lentes objetivas varia com o fabricante. Geralmente, FLUAR significa lente de fluoreto que transmite luz visível e luz ultravioleta (UV); PLAN ou PL significa lente de campo plano; e lente APO refere-se à lente apocromática, isto é, com correção para as aberrações das três cores azul, verde e vermelho, dentre outros.

Para maiores detalhes sobre tipos de lentes e principais vantagens, consultar os sites dos principais fabricantes de microscópios (OLIMPUS, 2007a; ZEISS, 2007; LEICA, 2007); sobre abertura numérica e resolução (MICROSCOPYU, 2007abcf); origens do microscópio (FIOCRUZ, 2007ab) e limitações dessa microscopia (WIKIPEDIA, 2007ab).

2.1. Tipos de Microscopias de Luz e suas Aplicações

Nesta parte do capítulo, pretende-se discorrer ligeiramente sobre as especificidades técnicas de diferentes microscópios de luz que poderão ser empregados no estudo da adesão e formação do biofilme, considerando-se a amplitude de resolução do microscópio de luz.

É preciso frisar, entretanto, que um microscópio, por mais bem equipado que esteja, não produzirá informações suficientemente boas para publicação se não estiver com o caminho luminoso muito bem ajustado. Para isso, principalmente antes de registrar as imagens, é imprescindível que se proceda à iluminação de Köhler, para cada aumento da objetiva a ser usada (HIBS, 2004): 1. Certificar-se de que a lâmpada do microscópio está focalizada na abertura frontal da condensadora. 2. Focalizar um espécime. Não mudar o foco durante o restante do procedimento. 3. Fechar parcialmente o diafragma de campo. 4. Focalizar a imagem do diafragma de campo, ajustando-se o botão de foco da condensadora. 5. Centralizar a imagem

do diafragma de campo dentro do campo de visão, usando os botões de ajuste na condensadora. 6. Abrir o diafragma de campo até que as margens desapareçam do campo. Esse é o limite para tal aumento. 7. Remover uma ocular e olhar dentro do tubo do microscópio e abrir o diafragma de íris até que ele ocupe 3/4 do campo da objetiva. Se fechar mais o diafragma de íris, o contraste aumenta, mas perde-se resolução, ou seja, a abertura numérica (AN) da lente não estará sendo usada em sua completa capacidade. A posição 3/4 é um equilíbrio entre resolução e contraste. 8. Controlar a intensidade de iluminação colocando-se um filtro óptico de densidade neutra ou ajustando-se o controle de intensidade de voltagem da lâmpada. Não use o diafragma de fase ou a condensadora de íris para ajustar a intensidade de luz.

Dentre os diferentes microscópios de luz, os mais usados nos estudos bacterianos são o de epifluorescência e o confocal (ZOTTOLA et al.,1997). Para maiores informações, consultar Wikipedia (2007ab), Microscopyu (2007e).

2.1.1. Microscopia de Luz Comum ou de Campo Claro

O microscópio de luz comum, também denominado microscópio de campo claro, é encontrado praticamente em todos os laboratórios.

Dentre os microscópios, é o mais fácil de usar, porém possui limitações: 1. baixo poder de resolução (restrita ao menor λ da luz visível); 2. normalmente, a profundidade de campo que pode ser examinada é pequena, com exceção das lupas; 3. só trabalha com apoio (lâmina e lamínula) transparente, como vidro, exceto a lupa; 4. o material, para ser observado, precisa ser translúcido à luz, entretanto precisam ser corados se forem hialinos, por exemplo células bacterianas. Apesar disso, inúmeras pesquisas em biofilmes microbianos foram realizadas utilizando esse instrumento e, assim, reconhece-se que é um instrumento útil na investigação inicial e na preparação de materiais bacteriológicos.

Geralmente, os microscópios de luz empregados em biologia permitem a observação de objetos transparentes aos raios de luz, com a exceção do microscópio esterioscópico ou lupa. Podem ser equipados com diferentes fontes de luz, condensadores, objetivas, oculares e lentes auxiliares, desempenhando funções diferentes, descritas nos tópicos subseqüentes.

2.1.2. Microscopia de Campo Escuro

O microscópio de campo escuro baseia-se no princípio de que a luz é dispersa ao atingir a superfície dos materiais que possuem diferentes índices de refração. É usado para aumentar o contraste de amostras não coloridas. Consiste num microscópio comum, cujo condensador é substituído por outro com um disco negro no centro e um anel hialino circundando o disco opaco. Assim, apenas os raios de luz

oblíquos, que atravessam o anel da condensadora, iluminarão o objeto. Graças ao efeito de Tyndall, os objetos aparecem brilhantes em conseqüência da dispersão da luz, enquanto o fundo permanece escuro. Ainda que o seu poder de resolução seja inferior ao do microscópio de campo claro, este microscópio permite detectar estruturas menores, sem que, todavia, os seus detalhes sejam distinguidos claramente. O microscópio de campo escuro é amplamente utilizado para a visualização e contagem de células bacterianas, em lâminas de vidro. Entretanto, devido ao brilho intenso das partículas, este sistema não pode ser usado para medições. Para maiores informações, consultar Wikipedia (2007c).

2.1.3. Microscopia de Contraste de Fase

O microscópio de contraste de fase é um microscópio óptico de luz dotado de um sistema óptico especial que transforma diferenças de fase dos raios luminosos em diferenças de intensidade. Desse modo, o microscópio de contraste de fase possibilita o estudo de materiais vivos e não coloridos porque acentua pequenas diferenças de índice de refração e de espessura entre os vários componentes da amostra.

Esse microscópio baseia-se no princípio de que a densidade de um corpo determina a velocidade com que a luz o atravessa e, conseqüentemente, diferentes densidades possuem distintos índices de refração. Quando uma partícula transparente, cujo índice de refração é próximo ao do meio em que está imersa, é atravessada por um raio luminoso, uma parte do raio atravessa sem se desviar, enquanto outra parte se difrata, desviando-se, não atingindo a objetiva. No microscópio de contraste de fase, o raio mais lateral que passa através da objetiva é adiantado de ¼ λ em relação à luz central, pela introdução de uma placa anelar, na objetiva e de um diafragma anelar no condensador. A placa anelar é um disco transparente com um sulco em forma de anel; ela é ajustada de forma a coincidir com a imagem direta do diafragma anelar do condensador. O efeito de fase decorre da interferência entre a imagem geométrica fornecida pela parte central da objetiva e a imagem difratada, dada pelos raios laterais que são adiantados em 1/4 λ. Essas diferenças, transformadas em diferenças de intensidade, são traduzidas em imagens luminosas às quais a retina é sensível. As objetivas para contraste de fase são marcadas com as letras Ph (*phase*).

Os microscópios equipados com contraste de fase são relativamente comuns nos laboratórios. São muito usados no estudo de células vivas e transparentes, que não podem ser coloridas. O efeito obtido é semelhante ao da iluminação DIC (*differential interference contrast*) embora sem a sofisticação da 3D (item 2.1.4.). Devido aos halos luminosos que formam em torno do espécime, não devem ser usados em medições porque tornam o limite muito impreciso. Esse tipo de microscopia

foi usado, com sucesso, nos estudos de adesão de esporos de *Bacillus subtilis, Bacillus cereus e Bacillus stearothermophilus*, espécies importantes comumente encontradas em leite cru, podendo sobreviver à pasteurização, e capazes de aderir às superfícies usadas para processamento de leite. Para maiores informações, consultar (MICROSCOPYU, 2007b).

2.1.4. Microscopia de Imagem Nomarski ou DIC (differential interference contrast)

A óptica Nomarski, ou imagem DIC, pode ser usada para observar células vivas, não coloridas, e outros materiais biológicos que sejam naturalmente muito pouco contrastantes. É uma óptica cara, embora muito usada em culturas de células animais, fungos e vegetais, dentre outros. O primeiro microscópio de óptica Nomarski foi produzido comercialmente, em 1965, pela Zeiss.

À medida que a luz atravessa a amostra, ela é submetida a diferentes fases pequenas, principalmente em função de mudanças no índice refrativo da amostra. A imagem final é muito interessante e informativa, porque a luz polarizada provoca um "sombreamento" das estruturas, formando uma imagem aparentemente tridimensional. O efeito 3D do DIC não é um 3D real, porque o efeito é produzido mais pelos diferentes índices de refração das estruturas do que pela forma e altura destas.

Para se proceder às análises DIC, o aparelho precisa estar equipado com peças adicionais especialmente projetadas para serem instaladas nas lentes objetivas e na condensadora de um microscópio de luz de campo claro. São dois prismas de Wollaston, ficando um situado logo abaixo da lente condensadora e o outro logo após a objetiva. O ajuste cuidadoso dos prismas é que dá maior ou menor efeito de "sombreamento" ou 3D à imagem. Não se pode esquecer, entretanto, de que a imagem DIC é produzida em um microscópio de luz, portanto a resolução da imagem permanece a mesma dos demais microscópios de luz, exceto o confocal. Isso significa que o trabalho com células isoladas de dimensões bacterianas tem baixa resolução, mas nos estudos de biofilme produz resultados interessantes.

Atualmente, tem-se usado a iluminação Nomarski em conjunto com o Confocal (veja 2.1.6.), o que tem gerado imagens muito ilustrativas porque delineia, no fundo, em tons de cinza, o espécime, ajudando a localizar na célula ou em parte do tecido o elemento ou a molécula fluorescente. Mais recentemente, com a popularização do uso do microscópio de força atômica (MFA) (veja 2.3.) entre os biologistas, a iluminação Nomarski também tem sido empregada como complementação das imagens obtidas pelo MFA, com grandes ganhos de informação, inclusive em estudos de células vivas (MADJ et al., 2006). Outro aspecto positivo do uso da iluminação Nomarski em conjunto com microscópios de fluorescência é que ele permite fazer

a localização do sítio que se pretende estudar antes de usar a luz UV que causa o apagamento da fluorescência, portanto reduz o branqueamento da amostra. Para mais informações, consultar Microscopyu (2007d).

2.1.5. Microscopia de Fluorescência

Desde 1940, explora-se a fluorescência, que é a propriedade pela qual uma molécula emite luz a determinado λ específico quando irradiado com uma luz de λ menor. Há uma exceção: microscópio multifotônico em que uma luz de grande λ é capaz de excitar um fluoróforo que emite λ curta.

O microscópio de fluorescência permite fazer estudo dos constituintes celulares ou células que manifestem autofluorescência ou fluorescência secundária a eles transmitida por corantes especiais chamados de fluoróforos (HIBBS, 2004). Aqui, é preciso fazer uma distinção entre fluorocromo e fluoróforo. O fluorocromo, também chamado de sonda fluorescente, é uma molécula normalmente protéica que exibe fluorescência; muitas vezes, é um anticorpo que carrega o fluoróforo. Assim, o fluoróforo é o elemento que fluoresce adicionado a uma proteína que, isolada, não é capaz de emitir fluorescência.

Para que ocorra a fluorescência, é necessário usar um conjunto de filtros que permitam passar apenas o comprimento de onda daquela luz emitida pelo fluoróforo excitado, o qual é observado fluorescendo em um fundo escuro. Emprega-se, para tanto, a luz ultravioleta (UV), de comprimento de onda inferior a 350 nm, de forma a se obterem radiações emitidas na faixa de 400 nm a 700 nm, isto é, nas várias cores do espectro da luz visível. As cores de fluorescência emitidas, então, dependem do fluoróforo usado ou, mais recentemente, dos genes do grupo de GFP (*green fluorescence protein*) hibridizado ao espécime. É com recurso da fluorescência que se evidenciam, por exemplo, os antígenos associados a anticorpos marcados com fluoróforos, ou fluorocromos, ou organelas em que se incorporou a proteína produzida pelo gene GFP (HIBBS, 2004).

Os microscópios de fluorescência são semelhantes aos convencionais. A diferença está na fonte de iluminação e no conjunto de filtros. Entretanto, os melhores resultados são obtidos com microscópios especialmente concebidos para esse fim, nos quais as lentes de vidro são substituídas por lentes de quartzo ou de fluorite; a fonte luminosa consiste de uma lâmpada de vapor de mercúrio que emite UV. É extremamente importante que, antes da ocular, seja inserido um filtro protetor para impedir a chegada de radiações ultravioletas aos olhos do observador, porque elas são extremamente perigosas e causam lesões à córnea.

Na bacteriologia, é comum usar marcadores fluorescentes nos estudos de filmes bacterianos (YU; MCFETERS, 1994). Normalmente, para estudos com bac-

térias tem-se preferido usar microscópio de fluorescência invertido, porque facilita a contagem de células em placas de Petri e lâmina de microscópio. Entretanto, o uso de microscópios de epifluorescência tem sido recomendado para estudos da adesão de *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* em cupons de aço inoxidável, polietileno e policarbonato; para a avaliação de contagem de placas, os resultados também foram mais bem avaliados com o emprego de epifluorescência (ANDRADE et al., 1998a; PARIZZI, 1999). No entanto, com *Enterococcus faecium* em aço inoxidável, a contagem em placas foi cerca de cinco vezes maior que na microscopia de epifluorescência, o que leva a crer que a contagem por microscopia subestima o número de células de *Enterococcus* sobre a superfície desses cupons, resultado discordante de outros encontrados na literatura (HOOD, 1996; PORETTI, 1990); os autores justificaram esses resultados conflitantes pelo uso de condições diferentes de estudos, como meio de cultura e microrganismos e vigor de agitação em vórtex (ANDRADE et al., 1998b).

Os microscópios acoplados a sistemas de análise de imagens que facilitam a contagem de células aderidas às superfícies tornam a microscopia de epifluorescência uma técnica extremamente útil à avaliação quantitativa dos processos de adesão microbiana. Além disso, a determinação da área coberta pelo crescimento microbiano na superfície, por meio de software associado à microscopia de epifluorescência, é uma evolução na avaliação de processos adesivos (BLACKMAN; FRANK, 1996). Vários fontes sobre epifluorescência estão disponíveis (MICROSCOPYU, 2007bd; PROBES, 2007; BIOSTATUS, 2007; AMERSHAMBIOSCIENCES, 2007; HELIXRESEARCH, 2007; ICNPHAM, 2007; QBIOGENE, 2007; MOBITECH, 2007; INVITROGEN, 2007; CPG-BIOTECH, 2007).

2.1.6. Microscopia de Varredura a Laser ou Confocal (MVLC)

O microscópio de varredura a laser ou confocal é um microscópio de fluorescência bastante sofisticado.

A vantagem do confocal sobre o de fluorescência-padrão é que ele permite: 1. seccionar opticamente a amostra, captando imagens de células e tecidos internos à amostra; 2. reconstruir tridimensionalmente a imagem, localizando a marcação fluorescente subcelular; 3. além disso, possui excelente resolução, de aproximadamente 0,3 a 0,1 micrômetro; 4. usa λs específicos, viabilizando marcações múltiplas; 5. possui sensibilidade muito alta, capaz de captar uma única molécula fluorescente; 6. trabalha com imagens digitais, de fácil manipulação e obtenção de imagens; e 7. é computadorizado, podendo ser inseridos múltiplos *softwares*.

O microscópio confocal combina o microscópio de fluorescência com a análise eletrônica da imagem e lasers, proporcionando imagens em três dimensões.

Os cortes histológicos mais finos, quando observados através de um microscópio de fluorescência comum, não permitem visualizar nitidamente toda a espessura do corte. Na prática, as lâminas são observadas usando-se o artifício de variar o plano de focalização através do botão micrométrico. Ao focalizar um plano ideal da célula ou do tecido, os demais ficam desfocalizados. Esse método tem o inconveniente de sobrepor as imagens desfocalizadas de outros planos à imagem nítida da amostra. O confocal soluciona esse inconveniente.

O confocal, uma vez que permite o seccionamento ótico da amostra, elimina da imagem a fluorescência das demais seções não focalizadas, eliminando a fluorescência fora de foco. Com isso, alcança-se uma nitidez de imagem muito superior à do microscópio de fluorescência comum.

Os primeiros confocais foram produzidos comercialmente nos anos de 1980 pelas Zeiss, Leica e BioRad. Existe mais de um tipo de confocal, segundo Hibbs (2004): o Laser *scanning confocal microscope*, a que se refere este capítulo, varre um ponto finamente focalizado através do objeto para criar uma imagem, usando *pinhole* (abertura) para eliminar focos indesejáveis de luz; o *Nipkow disk confocal microscope*, que usa um disco especial *Nipkow* para varrer várias centenas de *pinholes* através da imagem; esses *pinholes* removem a luz de foco e permitem, ao mesmo tempo, que se façam varreduras muito rápidas do objeto - usado para observação de objetos em rápido movimento, como bactérias em meio líquido, movimento Browniano de partículas, fluxo sanguíneo *in situ*, dentre outros; o *Slit scanning* confocal *microscope*, que usa uma fenda, em vez de *pinhole*, para remover a luz fora de foco. Também, é capaz de varrer rapidamente e pode ser observado diretamente com o olho nu. Ainda indisponível no mercado, o *Multiphoton microscope* varre pulsos de laser de vermelho distante (longo λ), através da amostra para gerar fluorescência a partir de corantes, que são excitados normalmente por λs muito menores (geralmente UV). A luz fora do foco é removida pelo fato de que a intensidade do laser já é suficiente para a excitação multifotônica do fluoróforo, apenas no plano focal; o SNOM ou *Scanning near field optical microscope*, usado para detectar fluorescência e imagem topográfica, ao mesmo tempo (OH et al., 2006). Ele segue o mesmo desenho do MFA (item 2.4.). Entretanto, na ponta do *cantilever* existe um *tip* recoberto de alumínio com um furo na ponta, onde termina uma fibra ótica que reduz o diâmetro da fibra para 10-100 nm. O feixe de luz emitido através desse orifício varre a amostra. A separação entre a fibra e o espécime é controlada pela parte MFA do sistema operando com deflexão do feixe de laser. O controle entre amostra e tip da fibra ótica é feito através de forças de van der Waals.

No MVLC, a iluminação é realizada por um delgado feixe de raios laser, que varre o corte, iluminando, ponto por ponto, apenas em determinado plano da célula

ou "fatia" óptica. A imagem é formada apenas pelas estruturas que se encontram nesse plano de varredura, sem que os componentes celulares situados noutros planos contribuam para a formação da imagem. Não somente a imagem é muito mais nítida, como também a célula pode ser "cortada" opticamente em vários planos, dependendo do aumento da objetiva usada. Cada plano da amostra é varrido e armazenado independentemente; em seguida, através de programas do computador, faz-se a remontagem dos planos, criando-se uma imagem 3D. De certa forma, ao "eliminar" planos indesejáveis do espécime, acima e abaixo do sítio de marcação, o confocal permite um "aumento" na resolução da imagem, porque os "elimina" opticamente. Essas marcações de fundo podem ser causadas por elementos autofluorescentes ou por resíduos livres de fluoróforos no líquido de montagem, dando à imagem uma aparência borrada, confundindo a interpretação.

A autofluorescência é provocada por várias moléculas, como resíduos de aminoácidos aromáticos, aldeídos, nucleotídeos de piridina reduzida, flavinas e resíduos de flavinas, protoporfirina de zinco, quitina, clorofila, lipofuscina (grânulos de pigmentos encontrados em células maduras), células apoptóticas ou mortas (células mortas apresentam autofluorescência), dentre outros. Entretanto, a autofluorescência pode ser usada a favor da imagem porque ela, algumas vezes, delineia a célula ou organela, assim como fornece indicação do estado de integridade celular, importante no estudo de viabilidade. Tudo vai depender do objetivo final do estudo. Entretanto, é preciso ter-se em mente, durante o planejamento da metodologia, que raramente a autofluorescência criada pela fixação do material é benéfica ao trabalho. O simples ato de fixar uma célula ou tecido pode resultar em altos níveis de autofluorescência devido apenas à presença de aldeídos que formam ligações cruzadas com proteínas. No caso de necessidade absoluta de fixação do material, é preferível que se use paraformaldeído ou formaldeído em vez de glutaraldeído. O melhor fixativo, provavelmente, seria a acetona ou o etanol. Para reduzir o efeito dos aldeídos, sugere-se lavar a amostra com uma solução de boroidrito de sódio.

Geralmente, as células são submetidas a um elemento fluorescente (YU; McFETERS, 1994), e a luz emitida é captada por um sistema de vídeo, digitalizada em computador e fica acessível num monitor. Essas imagens dos cortes ópticos podem ser armazenadas e utilizadas posteriormente para reconstituição da imagem tridimensional, ou para cálculos biométricos, como área e volumes. A preparação da amostra para ser observada no confocal é mais simples do que para fluorescência, porque o microscópio de fluorescência que usa UV emite o feixe luminoso em todos os comprimentos de onda da luz branca, além de UV; as amostras precisam ser cortadas em secções muito finas, de um a três micrômetros de espessura, enquanto para análise com confocal podem atingir 200 micrômetros de espessura, graças aos feixes de laser.

O equipamento de MVLC mais encontrado é provido de lasers de argônio de baixo poder e é refrigerado a ar. Esses lasers podem emitir uma variedade de comprimentos de onda, sendo os mais importantes aqueles de 488 nm e 514 nm; o primeiro corresponde ao máximo de excitação da fluoresceína, e o segundo estimula emissões da rhodamina e do Texas Red. Existem lasers capazes de emitir na região do ultravioleta, porém são mais caros e mais complicados de usar devido aos danos que podem causar aos olhos do observador. Os sistemas de laser têm iluminação de alta-intensidade, conferindo ao sistema boa sensibilidade e melhorando a resolução de fluorescência.

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado alguns modelos de confocal capazes de captar imagens de objetos em movimento. Entretanto, o número de pixels varridos para o registro da imagem pelo computador está em função da velocidade de excitação, ou seja, quanto maior a velocidade de varredura do laser para acompanhar o objeto em movimento, menor a resolução da imagem. É, também, o que ocorre com os microscópios multifotônicos, que não serão discutidos neste livro. Assim, ao se pretender adquirir um aparelho, esse fator deve ser cuidadosamente levado em conta na seleção do modelo de microscópio.

Stanley e colaboradores (2006) realizaram um excelente trabalho sobre placas de conexina Cx32, marcada com fluoresceína (FITC), e Cx43, com rhodamina (TRITC) no tendão de eqüinos, localizadas nas membranas citoplasmáticas de células adjacentes, formando canais intercelulares fortemente unidos. O trabalho foi possível de ser realizado graças à eliminação de marcações de fundo, típicas de fluorescência obtida por marcações com fluorocromos, resultando numa imagem clara, acurada e passível de repetição. No trabalho, os autores usaram um *software* que permitia quantificar rapidamente, antes que ocorresse a fadiga (veja em 2.1.6.1) do fluorocromo, e separar a fluorescência verde de fluorescência vermelha. As conexinas são subunidades glicoprotéicas transmembranárias, que fazem ligação entre células, por onde transitam metabólitos, íons e pequenas moléculas e também estão presentes em bactérias.

2.1.6.1. Soluções Antifadiga e Fluorocromos

Preparações antifadiga estão disponíveis no mercado. Essas soluções são usadas para aumentar a vida útil, ou seja, a duração do tempo de fluorescência, dos fluoróforos. Os primeiros fluoróforos, FITC, TRITC e Texas Red, dentre outros, fluoresciam por um período muito curto de exposição a UV. Atualmente, embora ainda sejam usados nas formulações convencionais, eles foram melhorados, aumentando a vida útil e introduzindo algumas características diferentes. Mais recentemente, passou-se a desenvolver grande número de fluoróforos novos e de outras origens.

As soluções antifadiga podem ser preparadas a partir de várias substâncias incluindo p-fenilenediamina (PPD); n-propyl gallate (NPG); 1,4-diazobicyclo [2,2,2]-octano e ácido ascórbico (vit.C). Usar 2 $mg.mL^{-1}$ de tampão PBS e fazer previamente um teste porque pode ser tóxico às células. Há soluções antifadiga preparadas comercialmente, como Vectashield, Slowfade, Fluoro Guard e Moliwal.

Dentre os corantes fluorescentes estão o FITC (isotiocianato de fluoresceína), TMR (tetramethyl-rhodamina), TRITC (forma reativa do TMR), Texas Red, grupo dos Alexa Fluor dyes e grupo dos Cyanine dyes. As sondas para ácidos nucléicos incluem DAPI, SYTO, SYTOX, propidium iodide, acridine orange, YOYO, TOTO e ethidium bromide (marca DNA e RNA duplos do citoplasma). São marcadores de DNA que usam UV, o DAPI e Hoechst 33258, SYTO, SYTOX, acridine orange. São marcadores apenas de células mortas: propidium iodide, ethidium bromide, acridine homodimer, cyanine dimer, cyanine monomer, SYTOX, YOYO e APOPTRAC.

Os indicadores fluorescentes de íons mudam o espectro da resposta em função de ligações específicas, medindo, assim, a concentração e o fluxo subcelular de íons. A mudança pode ser aumentando ou diminuindo a intensidade de brilho ou no λ de emissão. São muito úteis nos estudos de nível de contaminação de organismos vivos. Existem indicadores para íons de: Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}; Na^{+}, K^{+} ; Cl^{-}, Bi^{-}, I^{-}, tiocianato; Cu^{+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+} Al^{3+}, Ga^{3+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{2+}; Cs^{+}, fosfatos inorgânicos, cianido, selênio, tióis, sulfetos; nitrito (NO^{2-}); Eu^{3+}, Tb^{3+} (latanídeos); pH, $\Delta\psi$ (potencial de membrana). Os indicadores de Ca^{2+}, com luz UV, são Indo1, Fura2, Fluo3, Fura Red, BTC, Quin-1. Os indicadores Ca^{2+}, luz visível: Calcium Green, Calcium Orange, Cal Crimson, Fluo3, Fluo4, Fura Red, Fluo3+Furo Red, Mag-Fluo4, Mag-Indo1, Magnesium Green, Rhod2, X-Rhod1, Oregon Green 488 BAPTA, Calceína. São indicadores de pH o FDA, CFDA, BCECF, SNARF, SNAFL, HPTS, Oregon green, LysoSensor e LysoTracker. São indicadores de $\Delta\psi$ de membrana: DiI e DIO - para quaisquer membranas; Oxonal - para membranas despolarizadas; outros que marcam membranas de organelas estão descritos a seguir. Outros íons: Na^{+}: SBF1; K^{+}: PBF1; CL^{-}: derivados de 6-methoxy quinolimium como SPQ; Mg^{+}: variantes do quelante BAPTA e NO: DAF-2 diacetato.

Os Pontos Quânticos são nanocristais condutores prontamente excitáveis pela luz azul (488 nm) e emitem fluorescência em banda de emissão estreita de verde até vermelho, dependendo da composição e tamanho da partícula (geralmente 10 nm). Podem ser feitos de vários materiais: europium oxyde (Eu_2O_3) ou núcleo de cadmium-selenium (CdSe) coberto com zinco-enxofre (ZnS). O núcleo do cristal semicondutor é coberto com um polímero inerte ao qual são adsorvidas diferentes moléculas biológicas. A vantagem é que reduzem muito o problema de fadiga ou branqueamento da fluorescência e possuem alta penetração na célula viva por en-

docitose, devido ao seu reduzido tamanho, e são usados, também, em imunomarcação. Entretanto, são potencialmente tóxicos, por isso são bons para trabalhar com células mortas, fixadas, e são deficientes para estudar movimento molecular intracelular. Para maiores informações sobre confocal, princípios, filtros, espelhos, aberturas, fluoróforos e agentes antifadiga, pode-se consultar Microscopyu (2007). Para informações complementares, sobre marcadores ou provas fluorescente pesquisar em Probes (2007), Amershambioscience (2007), Helixresearch(2007), Icnpharm (2007) e Kpl(2007). Para Informaçãoes adicionais sobre proteínas fluorescentes consultar Qbiogene (2007), Mobitech (2007), Invitrogen (2007) e Cpg-biotech (2007).

2.1.7. Outros Tipos de Microscopia de Luz

Os microscópios descritos a seguir são, na verdade, microscópios normais descritos anteriormente que mudam de nome em função da localização da fonte de luz e, ou, da objetiva. Essas diferentes denominações fazem confusão entre pesquisadores que possuem menor convivência com esses aparelhos.

Com base na posição da fonte de luz em relação às lentes objetivas, um microscópio pode ser de luz transmitida ou de epiiluminação. No de luz transmitida, a fonte de luz fica situada na base do microscópio, antes da condensadora, atravessa a condensadora, o espécime, a objetiva e chega à ocular. Na epifluorescência, a fonte de luz fica situada na parte superior ou lateral do microscópio e o feixe luminoso atravessa a objetiva, e o espécime reflete em um espelho dicróico, retorna pela objetiva e atinge a ocular.

Com relação à posição dos componentes, um microscópio de luz transmitida pode ser também invertido, ou seja, as lentes objetivas ficam abaixo do espécime e a condensadora fica acima, conseqüentemente a fonte de luz fica na parte superior ou lateral do aparelho. O microscópio invertido é muito prático porque permite o estudo de culturas de células vivas em placas de Petri e não impede o exame de material em lâminas de microscópio, embora haja a necessidade de virá-las ao contrário, de forma que a lamínula fique voltada para baixo, em direção às objetivas. Para isso, as lamínulas devem ser bem fixadas com esmalte. Portanto, um microscópio pode ser de luz transmitida e, ao mesmo tempo, ser invertido.

Com relação ao poder de resolução, existem as lupas que podem ser manuais, aumentando em zoom até 8x ou montadas em um aparelho contendo uma (mono) ou duas oculares (binocular) que permitem um aumento adicional de 5x. As binoculares geralmente são chamadas de esterioscópicas. Atualmente, existem lupas que trabalham tanto com luz incidente quanto transmitida, possuindo duas fontes

de luz, uma acima da objetiva e outra abaixo do espécime. Não possuem lente condensadora. São ótimas para exames macros, de localização, porque observam tanto a superfície de objetos não transparentes e, ao mesmo tempo, se o material for translúcido, fornece alguma visão do interior de tecidos, em luz transmitida.

Com o rápido desenvolvimento dos aparelhos ajudado pela informática, vários *softwares* estão sendo constantemente jogados no mercado. Um deles pretende transformar imagens de campo claro em imagens 3D, baseando-se tanto no índice refrativo do espécime, que é obtido pela iluminação ou contraste DIC, quanto pela mudança de amplitude da onda de luz, pelo microscópio de contraste de fase, ou seja, pelos dois sistemas, concomitantemente (ALLMAN et al., 2006), eliminando os halos normalmente formados no contraste de fase.

Atualmente, têm sido mais e mais desenvolvidas "hibridações" entre tipos diferentes de microscópios, por exemplo o sistema de varredura de elétrons do MEV foi usado de forma semelhante no movimento físico do cantilever do MFA (item 2.4.) provocado pela interação da carga elétrica do espécime e o campo elétrico gerado na extremidade do *tip*. Igualmente, o confocal utiliza-se de um sistema de varredura (semelhante ao MEV); entretanto, usando um feixe de laser em vez de elétrons. Já existe um misto de varredura e MET, chamado de Microscópio Eletrônico de Transmissão por Varredura, e várias outras configurações.

O limite de resolução $\lambda/2$ dos microscópios óticos foi ultrapassado. À medida que caminhamos para o nanométrico, verificamos que são encontradas forças diminutas tanto na física quanto na biologia. Essas forças determinam uma série de eventos como estabilidade coloidal, adesão celular, motilidade celular, estabilidade de ligações específicas e mudanças conformacionais de proteínas (FLORIN et al., 1998). Da mesma forma, elas permitem manipular as células, o que é fundamental na biologia e na biotecnologia, em testes de imunofenotipia de superfície para diagnose, efeito da morfologia na diferenciação celular, na detecção de bactérias em alimentos, movimento Browniano (PRALLE et al.,1998) e movimento de vesículas secretoras em células vivas (ABU-HAMDAH et al., 2006).

Abu-Hamdah e colaboradores (2006) desenvolveram, em 1997, um microscópio óptico apropriado para fazer esse tipo de medição em amostras biológicas, o Microscópio de Força Fotônica (MFF) que, segundo eles, é um microscópio óptico com resolução nanométrica. Ele faz varredura tridimensional de um feixe de laser e baseia-se no princípio das tesouras ópticas. Existem outras técnicas de manipulação física de células, como forças acústicas e modificação celular, além da tesoura óptica e do MFF. Todos eles se baseiam nos princípios de forças elétricas de eletroforese,

que atuam em uma partícula fixa, ou de dieletroforese, que atuam na indução de carga. Ambas as forças podem calcular a força de adesão e a força necessária para o arraste de uma partícula (VOLDMAN, 2006). Para maiores informações, consultar Pubmedcentral(2007), Biophysj (2007) e Microscopyu (2007).

2.2. Microscopia Eletrônica

Nos primeiros decênios do século passado, em busca de informações mais detalhadas de amostras biológicas, o homem começou a pesquisar uma forma de suplantar os limites da resolução do microscópio de luz. A Figura 1 ilustra os pontos em comuns dos microscópios de luz e do MET e do MEV.

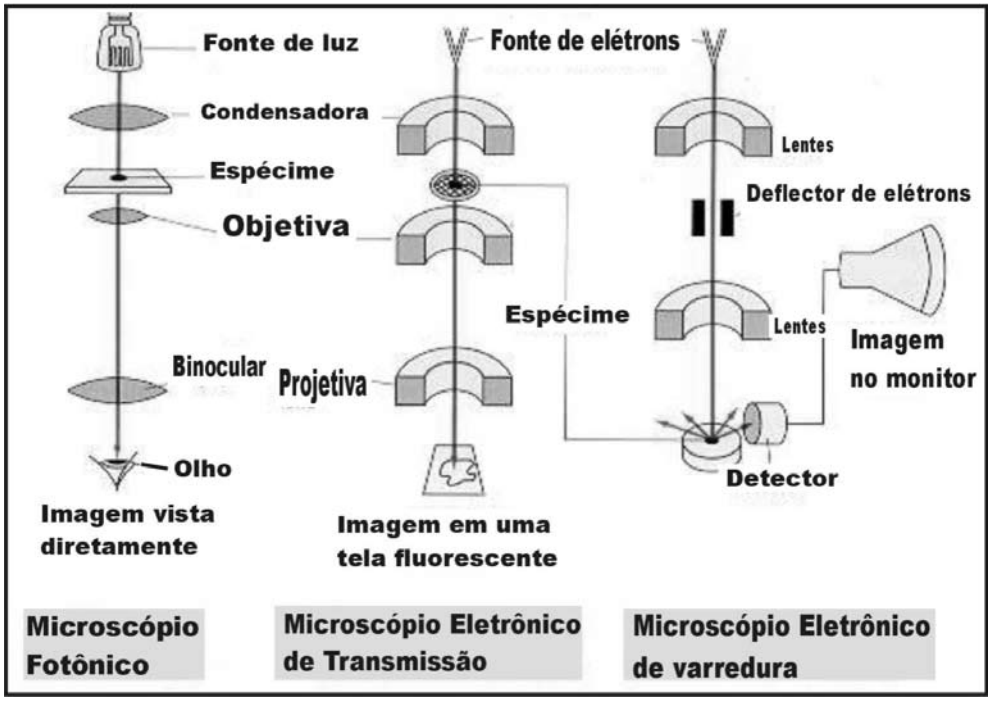


Figura 1 - Esquema dos microscópios óptico, eletrônico de transmissão e varredura, seus componentes e o processo de formação de imagens.

Meek (1976) fez um relato dos passos históricos da física até a construção comercial do primeiro MET. Bastante resumidamente aqui, e a título de curiosidade, ele informa em seu livro que pouco antes da metade do século 19 descobriu-se que a eletricidade de alta-voltagem, quando era direcionada para dentro de tubos de vidro cheios de gás à baixa pressão, produzia descargas elétricas; em 1850, descobriu-se como selar eletrodos de metal dentro de tubos de vidro emendados com alto vácuo. Cerca de 10 anos depois, descobriu-se que o que se chamava

de raios catódicos possuíam movimento retilíneo quando eram emitidos no vácuo. Esses raios catódicos eram carregados negativamente e eram defletidos por campos eletrostáticos e magnéticos. Em torno de 1899, foram produzidas as primeiras "lentes" magnéticas, que na verdade são campos magnéticos axialmente simétricos formados dentro do tubo de descarga, o que permitiu o controle do direcionamento dos feixes, assim como a concentração e a dispersão dos elétrons, ou seja, aumento e redução do diâmetro do feixe de elétrons. Em 1897, Braun já havia descoberto as telas fluorescentes quando excitadas por feixes de elétrons. Thomson, citado por Meek (1976), mostrou que os raios catódicos eram corpúsculos carregados negativamente com uma massa de aproximadamente um milésimo da massa de um átomo de hidrogênio. Esse corpúsculo foi depois chamado de elétron. Em 1926, descobriu-se que o campo magnético poderia desviar um feixe de elétron da mesma forma que as lentes de vidro ou quartzo desviam a luz visível. Assim, os fundamentos para a óptica eletrônica foram estabelecidos. Rapidamente, todas essas informações culminaram nos primeiros estudos sobre o microscópio eletrônico, em torno de 1933, por Ruska e colegas, na Alemanha. Em 1945, logo após a Segunda Grande Guerra, foi colocado no mercado o primeiro MET comercial, marca Siemmens, modelo ÜM-100. Para esse microscópio, Ruska e colaboradores acompanharam "eletronicamente" o mesmo desenho do microscópio de luz transmitida. A partir do MET, foram necessários poucos anos, cerca de 10 anos, para surgir o primeiro microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A ambos os aparelhos, MET e MEV, pode-se acoplar um sistema de microanálise de raios X (*Energy-Dispersive X-Ray Microanalysis* (EDS), que permite estudar a composição química da amostra, com vantagens sobre a química analítica, porque os elementos podem ser mapeados *in situ*, o que permite identificar a posição em que esses se encontram na amostra (MUSSETTI; FAVALI, 2003).

Para que possa ser explorado em toda a potencialidade, com máxima resolução, um microscópio eletrônico precisa ser instalado em local adequado, com umidade e temperatura controladas, além de estar bem isolado de campos magnéticos e de vibrações produzidas pela proximidade de ar-condicionado, bombas de vácuo, elevadores, estabilizadores de voltagem; deve-se também evitar proximidade com ruas de trânsito pesado (MEEK, 1976; MULLER et al., 2006). Para maiores informações, consultar Scholar Google (2007).

Os diferentes tipos de elétrons produzidos após a incidência de um feixe de amostras sobre um espécime estão esquematizados na Figura 2.

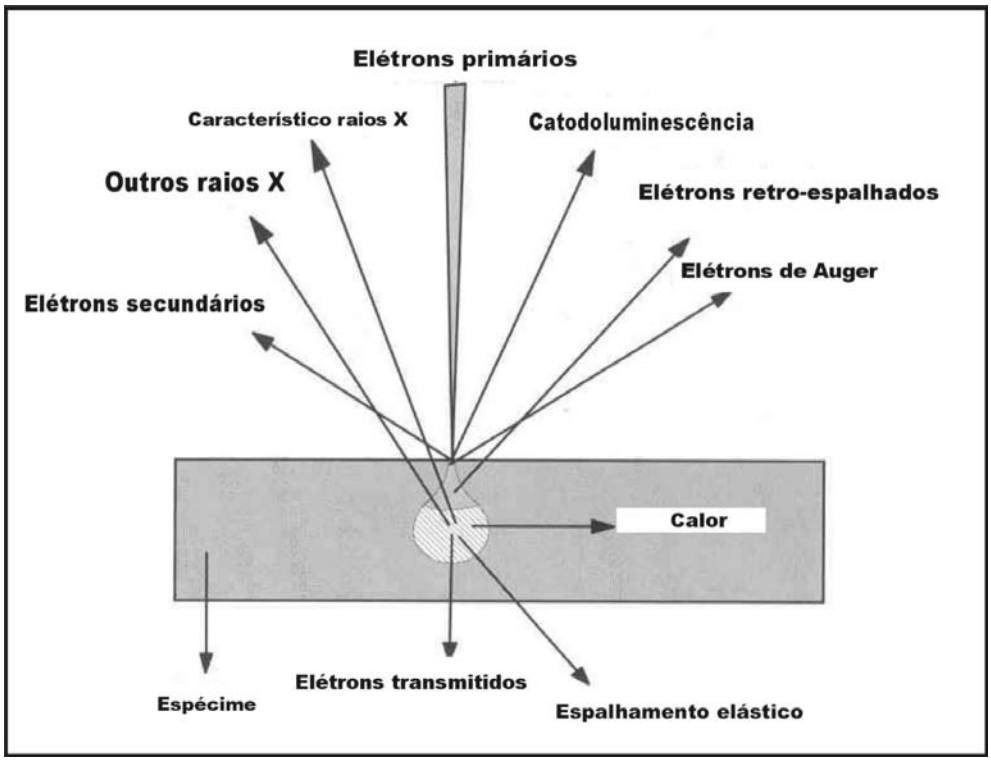


Figura 2. Esquema da interação elétron/amostra gerando diferentes sinais e área/volume da amostra envolvida na emissão de elétrons secundários, retroespalhados e raios X da amostra irradiada pelos elétrons primários.

2.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) tem uma única vantagem sobre o microscópio óptico de luz: maior capacidade de resolução, ou seja, ele é capaz de formar imagens claras e nítidas de objetos até mil vezes menores, isto é, a sua resolução é da ordem de 1-2 nm, ou seja, 1.000 x melhor que a do microscópio de luz. Os princípios básicos sobre o MET podem ser encontrados no livro de autoria de Meek (1976). O espécime tem de ser suficientemente fino para permitir a passagem de 50-90% dos elétrons (MEEK, 1976); o feixe o atravessa em maior ou menor intensidade, dependendo do grau de eletrodensidade da região. As partes mais eletrodensas desviam os elétrons, que não atingem a tela, formando uma sombra na tela fluorescente, enquanto as partes menos eletrodensas são atravessadas pelo feixe, que vão excitar as moléculas da tela. O resultado é a formação de uma imagem em claro/escuro, semelhante às de fotografias em preto/branco.

O funcionamento do MET, resumidamente, consiste no descrito a seguir: a fonte de elétrons do aparelho é um filamento metálico de tungstênio incandescente que aquecido emite elétrons que são atraídos para a primeira abertura onde passam por

uma primeira seleção, formando o feixe inicial de elétrons. Esse feixe é condensado pela lente condensadora e incide sobre a amostra a ser examinada. Ao atravessar a amostra, os elétrons são desviados uns mais do que os outros. O feixe de elétrons, com os desvios introduzidos pela amostra, é ampliado pela lente objetiva. Até aqui, é idêntico ao que ocorre no microscópio de luz transmitida. Parte desse feixe é, por sua vez, dispersado por outros campos magnéticos que agem como lentes projetivas. Como a nossa visão não é sensível aos elétrons, a imagem é projetada sobre um écran fluorescente. O registro da imagem é feito em filmes fotográficos ou digitalizados por câmaras CCD. No estudo da adesão e formação dos biofilmes, o MET tem permitido visualizar detalhes morfológicos das bactérias como a presença de parede, membrana, cromatina, fimbrias, flagelos e a estrutura e composição do biofilme. Na Figura 2 está esquematizado o funcionamento do MET.

a) Método de Emblocamento de Amostras Biológicas e o Porquê de Fazê-lo

O interior da coluna do MET fica sob alto vácuo, exigindo que as amostras sejam pré-fixadas em fixadores aldeídicos, por exemplo glutaraldeído, formaldeído, paraformaldeído, isolados ou em combinação preparados em tampões; e pós-fixadas em tetróxido de ósmio ou $KMnO_3$ e, então, desidratadas em séries crescentes etanólicas ou acetônicas para evitar que a água interna seja sugada violentamente pelo vácuo, destruindo a amostra. Como as paredes e as membranas biológicas são extremamente seletivas, moléculas grandes têm dificuldade de atravessá-las. Por isso, é muito importante que as dimensões do espécime sejam bastante reduzidas para bloquinhos de aproximadamente 1 mm x 1 mm x 1 mm ou 1 mm x 1 mm x 3 mm. No entanto, o feixe de elétrons tem baixo poder de penetração e as amostras precisam ser extremamente delgadas, no máximo 100 nm de espessura. Para que sejam seccionadas sem causar modificações ultra-estruturais, os espécimes precisam ser embebidos em resina (por exemplo Spurr, Epon, Araldite, Lowicryl e Unicryl dentre outras). As resinas são escolhidas de acordo com a finalidade do estudo e da qualidade ou facilidade de impregnação do tecido (BUSCHMANN et al., 2002). Em seguida, as amostras são emblocadas em molde de silicone ou cápsulas de BEEM ou gelatina e polimerizados de acordo com o fabricante. Depois, os bloquinhos serão seccionados em secções semifinas - para observação prévia em microscópio de luz - e, ou, ultrafinas, de 60-100 nm de espessura, com navalha de diamante ou de vidro, na qual é colocado água para que, à medida que os bloquinhos vão sendo seccionados, as secções flutuem na superfície. Como a essa espessura as secções são transparentes na lupa do ultramicrótomo, é necessário que uma fonte de luz incida sobre elas. Somente os cortes que refletirem prateado ou dourado-claro é que poderão ser usados para observação no MET. Os cortes, então, são estendidos com vapor de xilol ou clorofórmio e, depois, recolhidos em telinhas (*grid*) de 3 mm

de diâmetro, de 50-300 mesh ou de um único furo. Uma película de plástico Formvar 0,3%, extremamente fina (20 nm), é utilizada como lâmina de microscópio e reveste a telinha, que pode ser de cobre, níquel ou ouro, dependendo dos reagentes a que será submetida. Sobre essas telinhas com formvar podem ser examinados materiais em suspensão como frações celulares, moléculas, vírus e bactérias ou cortes histológicos de 50-100 nm de espessura.

O MET trouxe contribuições importantes para o conhecimento humano, ao mostrar detalhes jamais visualizados na área biológica. Sem dúvida, é um equipamento que abrange amplo campo de estudos, como imunológicos, citológicos, enzimológicos e biofísicos, tanto na área animal, vegetal e de microrganismos quanto na área morfológica da nanotecnologia (RASKAS, 2003).

Por não trabalhar com ondas do espectro visível, não é possível obter imagens coloridas. As imagens coloridas que são mostradas em revistas e periódicos são resultantes de manipulação artificial da imagem em preto e branco em programas específicos para computador. Portanto, tratamentos com colorantes usados na microscopia de luz como azul-de-algodão, safranina, toluidina, rodamina e outros não possuem nenhum efeito colorante, embora alguns como o violeta e o vermelho de rutênio e o "Alcian blue" sejam usados em algumas técnicas por possuírem elementos na sua composição que são eletrondensos (HAYAT,1975). No entanto, como os cortes são extremamente finos, a difração do feixe de elétrons sobre a amostra não contrastada é insuficiente para a obtenção de imagens nítidas. Por isso, na MET são rotineiramente usados contrastantes eletrodensos como acetato de uranila, citrato de chumbo, hidróxido de chumbo, tartarato de chumbo, acetato de chumbo, ácido fosfotungústico, permanganato de potássio, tetróxido de ósmio (que também é um forte fixador usado rotineiramente em pós-fixação), colóide de torium e outros (HAYAT,1975). Esses contrastantes, por possuírem maior ou menor afinidade com lipídeos, polissacarídeos, glicoproteínas, lipoproteínas, proteínas, enzimas e outras proteínas, fazem que, na biologia, sejam intensivamente usados nos estudos de detalhes morfológicos e fisiológicos de organelas inteiras, como membrana plasmática, núcleo, nucléolo, cromossomos, cloroplasto, mitocôndria, centro celular e plasmodesma, até então conhecidas por meio de colorações específicas, em microscopia de luz. Também permitem o estudo tanto morfológico quanto fisiológico de uma série de outros componentes, como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, presença de lisossomos, colóides, multivesículas, cromatina, cromossomo, ribossomos, microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermediários, lisossomo, peroxissoma, complexo juncional, junções comunicantes, glicocálix e características internas e externas de microrganismos, como a presença de parede celular, flagelos e fímbrias. Alem disso, em conjunto com a imunomarcação, permite verificar a presença de íons como cálcio, ferro e enxofre, dentre outros.

b) Método de Imunomarcação

Nas décadas de 1970-1980, por meio de técnicas de imunomarcação ou de uso de sondas específicas, iniciaram-se os estudos sobre a localização exata de moléculas protéicas e epitopos, açúcares, ferritina, proteínas, ácido nucléico, pectina, celulose, hemicelulose e outros, abrindo, inclusive, um campo vasto para a enzimologia (HAYAT, 1989; van NOORDEN; FREDERIKS, 1992). Nos estudos de imunomarcação, os antígenos usados (primeiro ou segundo anticorpo, dependendo da técnica) são marcados com uma sonda eletrodensa, opaca ao feixe de elétrons, como esferas de ouro coloidal de 1 μm a 20 μm de diâmetro ou ácido fosfotungústico (PTA), ferricianeto, DAB (3,4,3',4'-tetraaminobifenilidrocloreto), cobre-glicina e outros (WANG, 1986; HAYAT, 1989; LEWIS; KNIGHT, 1992).

Na imunomarcação com dois anticorpos, a telinha é posta com a seção ultrafina voltada para uma gota do primeiro anticorpo não marcado. Depois de lavada em tampão, é transferida para o segundo anticorpo, marcado com a sonda, que foi produzido contra o animal no qual foi produzido o primeiro anticorpo. Apenas as moléculas de antígeno que ficaram expostas na superfície seccionada irão reagir com o primeiro anticorpo; as que estiverem imersas na resina, não reagem porque estão com os sítios de reação bloqueados. Alguns tipos de resina (Lowicryl, Unicryl, Epon) são levemente hidrofílicas, permitindo que o antígeno reaja com moléculas expostas na superfície e aquelas ligeiramente imersas na resina.

Na imunomarcação com apenas um anticorpo, esse precisa estar marcado com a sonda eletrodensa. Nesse caso, a marcação é menor porque a relação será de um anticorpo marcado para um antígeno.

Alguns cuidados são muito importantes na imunomarcação, como: no delineamento do trabalho é necessário constar, sempre, todos os tipos de testemunha positivas e negativas para amostra e antissoros. Deve-se, também, suavizar a fase de pré-fixação e, se a quantidade de antígeno esperado de encontrar na amostra for muito baixa, evitar o uso do tetróxido de ósmio que é um potente bloqueador de sítios. Todos os bloqueadores de marcação de fundo como soro normal, BSA, Tween 20 e outros precisam ser usados para neutralizar os aldeídos, cargas livres e outros. Quando se usa ouro como marcador, as secções podem ser osmicadas e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo depois de terminado o processo de imunomarcação. Para maiores detalhes, consultar Hayat (1989).

c) Métodos para Observação em 3-D

Como foi dito anteriormente, o MET apresenta limitações impostas pela necessidade do alto vácuo na coluna e pelo baixo poder de penetração do feixe de elétrons. Assim, além de limitar o estudo aos espécimes mortos, bem fixados e

emblocados em resina, o exame deles só pode ser realizado em secções ultrafinas (50-80 nm de espessura de preferência), o que dificulta a visualização da organização tridimensional das estruturas. Contudo, certo nível de informação 3D pode ser obtido pela montagem de fotografias de secções seriadas superpostas, uma a uma, ou de técnicas especiais como moldagem por congelamento (*freeze-etching*) e a criofratura (*freeze fracture*) (PARSON, 1970), que são bastante trabalhosas, como descrito a seguir.

Os métodos de criofratura e criomoldagem foram tentados pela primeira vez em 1950, por Hall (PARSON, 1970). Esses métodos permitem o estudo ultra-estrutural tridimensional com a resolução permitida pelo MET, ou seja, 0,1-0,2 nm. São métodos mais trabalhosos que, através do congelamento rápido do espécime, permitem que se trabalhe com material hidratado, ainda vivo antes do congelamento, disponibilizando informações morfológicas mais reais, em especial as membranas, porque não sofrem efeito estressante de reagentes fortes. Resumidamente, o espécime é congelado e, em seguida, uma pequena porção da sua superfície é transferida para o vácuo, onde o gelo sofre sublimação, deixando as estruturas não voláteis como projeções na superfície. Faz-se, então, uma réplica ou molde da superfície exposta, primeiro com uma liga carbono-paládio que depois é reforçada com carbono pulverizado em ângulo. A réplica ou molde ainda presa ao espécime desidratado é posta a flutuar em água para que o espécime se desprenda da réplica que flutua. A réplica, então, é montada em telinha e examinada no MET, fornecendo imagem em 3D (PARSON, 1970).

O exame de espécimes preparados por criofratura e criomoldagem não permite um direcionamento préestabelecido do sentido da fratura, porque ela ocorre ao acaso, embora a tendência seja de células fraturarem ao longo da superfície das membranas internas ou externas. Entretanto, algumas vezes a fratura pode ocorrer em planos tangenciais da amostra, deixando exposto em 3D nanométrico, no sentido Z da amostra, as organelas internas, além dos detalhes morfológicos das membranas, como poros, e também detalhes de paredes celulares, ribossomos, cloroplastos, mitocôndrias, vesículas, retículo endoplasmático e Aparelho de Golgi. Smarda e colaboradores (2001), realizaram um estudo detalhado das camadas S das paredes celulares de cianobactérias usando o método de criofratura e criomoldagem e demonstraram que cada camada S é formada por feixes bidimensionais, monomoleculares cristalinos de unidades idênticas de proteína ou macromoléculas de glicoproteínas arranjadas em uma de quatro possibilidades de tipos 2D de látice: oblíquo, triangular, quadrado ou hexagonal.

Em 2006, foram apresentados dois métodos de manipulação de imagem que reproduzem a forma 3D obtidas de cortes ultrafinos observados no MET, sem usar a

metodologia da criofratura. Um deles foi descrito na seção sobre outros microscópios de luz, e baseia-se no uso da imagem obtida pela refração de elétrons no MET (ALLMAN et al., 2006), enquanto Fiala e Harris (2006) afirmaram que, através do programa gratuito disponível na internet (http://synapses.bu.edu/tools/), é possível obter imagem 3D com a remontagem de imagens de cortes seriados. O mesmo sistema pode ser usado para imagens feitas em confocal.

d) Método de "leaf-dip"

Outro método para observação no MET, chamado de "leaf-dip" (HAYAT, 1972), é um método rápido e consiste da contrastação negativa do material disposto sobre uma telinha recoberta com formvar 0,3%. Muito usado na diagnose de vírus, também é útil no estudo de bactérias. Dá indicação sobre a disposição dos látices protéicos da parede, presença de flagelo e morfologia. Sobre uma telinha de cobre recoberta com formvar 0,3%, adiciona-se uma gota de uma suspensão bacteriana contendo $1x10^9$ células por mL, e sobre essa gota adiciona-se uma gota de acetato de uranila 5% ou de ácido fosfotungústico em K ou Na (KPTA ou NaPTA). Deixa-se reagir por aproximadamente 20 segundos, e seca-se cuidadosamente com papel-filtro. Depois de seca, a telinha pode ser observada no MET. É chamada de contrastação negativa porque, contornando a bactéria, forma-se uma faixa eletrodensa, enquanto a bactéria permanece clara. Sobre técnicas de uso do MET e de preparação de espécimes biológicos para observação no MET, consultar, também, Hayat (1970, 1972, 1975, 1989), Parson (1970), Souza (1998).

2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A capacidade que o microscópio eletrônico de varredura (MEV) possui de formar imagem tridimensional em uma escala muito ampla de aumento é, talvez, a sua característica mais interessante na pesquisa biológica, especialmente na sistemática, ecologia, estudos evolucionários, morfologia e interpretação (HEYWOOD, 1971; ZOLTAI et al., 1981; GLAUGHER, 1990).

Em meados do século passado, entre 1963-65 foram desenvolvidos comercialmente os primeiros MEVs. A introdução desse microscópio causou uma segunda revolução no estudo do mundo microscópico, em virtude de suas características como a alta profundidade de campo de trabalho, que confere o aspecto tridimensional às imagens; ampla gama de aumento (10 X– 1.000.000 X); alta resolução que alguns aparelhos atingem, cerca de 2-3 nm, sendo o mais comum entre 20 e 30 nm; a rápida digitalização do sistema de captação de imagens, aliada às relativas facilidades de operação e preparação da amostra, tornou este aparelho extremamente popular.

Ao contrário do MET, em que o feixe de elétrons atravessa o espécime, no MEV, os elétrons primários são usados na varredura da superfície das amostras metalizadas. Eles refletem ou atravessam o espécime, gerando vários tipos de emissões eletrônicas (HEYWOOD, 1971; POSTEK et al., 1980) como elétrons secundários, retroespalhados, catodoluminescência, raios X, cada um capturado por receptadores específicos e transformados em imagem num monitor. Na Figura 2, encontra-se o diagrama esquemático de funcionamento do MEV. Os elétrons secundários refletidos sobre a superfície da amostra, que são os mais usados, são emitidos em diferentes ângulos, dependendo da topografia do material. Esses elétrons de diferentes ângulos são captados por um receptador de elétrons secundários, decodificados e transformados computacionalmente em imagem, em um monitor.

Deve-se considerar também que, apesar de técnicas microscópicas terem levado a uma grande quantidade de informações sobre os processos de adesão microbiana e formação de biofilme, elas apresentam alguns problemas que devem ser considerados. Dentre eles a interpretação das imagens que produzem, dependendo dos procedimentos utilizados. Os exopolissacarídeos, por exemplo, que geralmente envolvem as comunidades microbianas, podem secar, aparecendo cordões finos que podem ser interpretados como estruturas fibrosas que prendem os microrganismos a si mesmos (WIMPENY et al., 2000). A técnica a ser escolhida depende do aspecto da interação do biofilme ou da sua formação que se deseja analisar, daí a importância de se conhecer previamente o material com o qual se trabalha, em níveis macro e de microscopia de luz.

A resolução de uma imagem depende de vários fatores: da voltagem de aceleração; da morfologia, da topografia e da densidade do material; da estabilidade e do isolamento do aparelho de campos magnéticos externos, do movimento do ar e das vibrações físicas; do tipo de captação de elétrons usados (se elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X, catodo-luminescência); de lentes magnéticas, diâmetro da abertura usada; *tilt* ou inclinação da mesa dos espécimes, diâmetro do feixe de elétrons; velocidade da varredura; balanço entre brilho e contraste, distância entre pistola de feixe e superfície da amostra, dentre outros. Todos esses fatores precisam estar em perfeito equilíbrio, de acordo com cada espécime. Outro fator muito importante a ser considerado é a densidade de elétrons presentes no espécime, porque o número de elétrons secundários emitidos se eleva com o aumento do número atômico do material (POSTEK, 1980). Daí a necessidade de se cobrir os materiais não-eletrocondutivos com camada nanométrica de metal, de no máximo 20 nm (ouro, paládio, alumínio ou ligas) para torná-los condutivos sem que se percam detalhes topográficos. Quando se fala em examinar uma superfície

topográfica de um material, não significa que o estudo obrigatoriamente ficará restrito à superfície externa de um órgão. Os diferentes tecidos internos ou o interior de células de um tecido, desde que sejam expostos por seccionamento ou fratura durante a preparação, após a fixação, podem também ser estudados. Portanto, as células bacterianas poderão ser observadas tanto na superfície externa de uma folha ou de cupons de qualquer constituição, por exemplo, quanto no interior dos diferentes tecidos que compõem a folha, bastando apenas seccioná-la.

As amostras biológicas, além de não serem condutoras de elétrons, são mais difíceis de trabalhar devido à sua constituição macia, isto é, o feixe de elétrons pode causar danos e deslocamentos de partes do material provocando descargas visíveis como faixas claras nas imagens. Para amostras sensíveis, como é o caso da maioria das amostras biológicas, as voltagens usadas são de 1-20 KV, mas para materiais rígidos, como os examinados em ciências de materiais, pode-se chegar a 40 KV. A resolução da imagem será tanto melhor quanto maior for a voltagem e menor a distância entre a ponta inferior da coluna do instrumento e a superfície da amostra.

Atualmente, encontram-se no mercado aparelhos que trabalham a baixo vácuo, com pressão variável (PV) dentro da câmara, o que permite examinar amostras parcialmente hidratadas e emissoras de gases sob vácuo. Entretanto, esse tipo de varredura produz imagens de qualidade inferior às emitidas por elétrons secundários (metalizadas ou condutoras), embora seja uma técnica eficiente para diagnose rápida (TOTH et al., 2003). Alguns modelos mais modernos de microscópios podem ser equipados com um acessório que resfria a câmara para permitir a observação de materiais hidratados e congelados. Nesse caso, são observados sem cobertura metálica, à baixa pressão dentro da câmara, no baixo vácuo, para que não ocorra sublimação do gelo. Também, a imagem obtida por essa técnica é de qualidade inferior à obtida pelos elétrons secundários, mas preservam a estrutura de materiais muito delicados.

É possível observar amostras já incluídas em resina, que foram preparadas inicialmente para cortes ultrafinos para observação no MET, portanto com superfície uniformemente plana, pela técnica de "backscattered" ou elétrons retroespalhados, embora a resolução da imagem também não seja tão boa quanto à obtida de elétrons secundários (PIERRE et al., 2005). Nesse caso, a imagem formada é devida à diferença do número atômico entre a resina e o espécime e não à topografia (POSTEK et al., 1980), e a imagem produzida é visivelmente plana. O elétron captado é o emitido abaixo da superfície da amostra, portanto, de preferência, deve-se recobrir o material com fina camada de carbono em vez de metal.

a) Preparação de Amostra Biológica para Observação a Alta Voltagem ou Alto Vácuo

Na preparação prévia de uma amostra biológica úmida para observação no MEV, sob alta voltagem, é preciso fazer a pré-fixação da amostra em aldeído (glutaraldeído ou paraformaldeído + glutaraldeído) e pós-fixação em tetróxido de ósmio (dispensável), depois a desidratação em série crescente de etanol ou acetona (ver item 2.2.1.). Ainda no etanol ou acetona 100%, o material é transferido para o aparelho de secagem no ponto crítico, onde o álcool ou a acetona são trocados por CO_2 líquido, gradativamente, à temperatura de 5-8 °C, para manter o CO_2 ainda em estado líquido. A temperatura da câmara é, então, elevada lentamente até 40 °C, quando a pressão da câmara atinge entre 60-70 bar, devido à expansão do gás de CO_2. Nessa pressão e temperatura, o CO_2 líquido se transforma em gás sem alterar a morfologia do material. Depois, então, o material é fixado em suportes (*stubs*) com fita adesiva de dupla face comum ou de carbono condutiva ou colada com colóide de carbono ou prata que também são condutivos. Em seguida, é levado para um metalizador, onde será pulverizado com átomos de metal condutivo, sendo os melhores o ouro e a liga de ouro-paládio. É necessário que a cobertura seja fina o suficiente para formar um filme uniforme e condutivo, mas sem que provoque a perda de detalhes nanométricos da topografia por "entupimento" das depressões. Para variações da metodologia, consultar Heywood (1971), Postek et al. (1980), Glaugher, (1990).

Outra técnica interessante de preparar material muito frágil e que se desprende facilmente sob vácuo é o usado por Tiedt e colaboradores (1987). Em vez de fixarem a amostra em soluções de glutaraldeído e tetróxido de ósmio, esses autores fixaram-na em vapor de tetróxido de ósmio, sem passar pela solução de glutaraldeído, usando uma capela de exaustão durante o manuseio, tendo-se em vista que o tetróxido é altamente perigoso à inalação e ao contato. Nesse caso, a amostra é colocada dentro de uma placa de Petri, e, na face inferior da tampa da placa, adicionam-se umas gotas de tetróxido de ósmio 2%; depois, cuidadosamente a placa é novamente tampada e vedada com parafilme. O conjunto deve ser incubado por tempos variáveis, de 2 horas a 24-48 horas, conforme o material. Depois, a amostra é retirada da placa, e continua-se o processo de desidratação, secagem no ponto crítico e metalização.

Também ao MEV pode ser acoplada, com vantagens adicionais, uma sonda de raios X, o que vai unir a alta resolução dos elétrons secundários à microanálise para examinar, por exemplo, a constituição e localização de íons e mudanças nas concentrações iônicas durante a apoptose celular , dentre outros (ver item 2.3). Para maiores informações, consultar Analitic (2007) e Wikipedia (2007d).

b) Acessórios: Sonda ou Microanalisador de Raio-X

O Microanalisador ou Sonda de Raios X não é, exatamente, um microscópio eletrônico. Ele é um acessório dos MET e MEV (TERACHI; KAWANA, 2006.) que permite realizar análise química das espécies atômicas que compõem, normalmente, as amostras. O MET ou MEV, estando equipado com detector de raios X (sonda acessória), é capaz de localizar minerais, como cálcio, ferro, enxofre e outros, dentro de células ou tecidos (LEWIS; KNIGHT, 1992).

A análise é feita normalmente durante o exame normal do material ao microscópio. Durante a emissão do feixe eletrônico sobre a amostra, o feixe de elétrons colide com um espécime sólido, interage com a matéria, emitindo, também, radiação eletromagnética produzida pelo deslocamento orbital do elétron pelo feixe. Sempre que um feixe de elétrons interage com átomos, os elétrons incidentes deslocam os elétrons desses átomos, gerando elétrons secundários. A diferença de energia é emitida em forma de raios X, cujas características de comprimento de onda ou energia estão em função do elemento que o emite.

Medindo-se com um espectrômetro tanto o comprimento de onda quanto a energia de cada raios X emitidos, pode-se, assim, fazer uma análise qualitativa e quantitativa dos átomos que compõem o espécime, mas não é possível formar uma imagem gerada pelos raios X emitidos. A figura obtida é em forma de gráfico. A comparação dos raios X produzidos pelas amostras com os raios X de elementos-padrão permite identificar os elementos que emitiram os raios detectados. Os mais leves são mais dificilmente detectados, sendo a identificação mais segura a partir do sódio. Além disso, a área da amostra que gera raios X é de tamanho várias vezes ao do diâmetro do feixe incidente e, portanto resulta em menor resolução.

O MET, assim como o MEV, ao ser equipado com esse acessório, devido à alta resolução que eles alcançam, permite fazer análises localizadas de raios X, nas amostras, o que antes era impossível. Anteriormente, só eram feitas análises de composição atômica em amostras de tamanho “macro”.

Os raios X acoplados ao MET ou MEV são muito úteis nos estudos sobre poluentes, como chuvas ácidas, pesticidas, bactérias que vivem e sobrevivem em locais de condições extremas de sobrevivência, dentre outros (NEWBURY et al., 1986; BOZZOLA; RUSSEL, 1999). Para maiores informações, consultar Scholar. Google (2007).

2.2.3. Microscopia de Raios X

As imagens obtidas nos primeiros microscópios de raios X baseavam-se em técnica gráfica de sombreamento e não possuíam alta definição. Essa técnica é devida à atenuação diferencial dos raios X pelos componentes da amostra. Enquanto a atenuação era efetiva para amostras com forte capacidade de absorção, o contraste de amostras de fraca absorção era muito fraco.

Segundo Brownlow e colaboradores (2006), em 1930 surgiu o primeiro microscópio de raios X de projeção pontual; a resolução era muito limitada em função da fonte de raios X. Em 1950, foram introduzidas melhorias e usadas lentes magnéticas para reduzir o feixe de elétrons produzindo feixes de raios X menores. Grande parte dos microscópios de raios X distribuídos nos centros de pesquisa está baseada no projeto desenvolvido, em 1978, por Horn e Waltinger. Nele, o equipamento de raios X fica acoplado a um MEV (NEWBURY et al., 1986), de forma que, usando o processo de feixe eletrônico e as "lentes" magnéticas do MEV, também fosse produzido um feixe fino de raios X; mas a baixa densidade da fonte de elétrons resultou em baixas intensidades de raios X e isso, combinado com filmes de baixa capacidade de detecção, exigia que fossem usados períodos de exposição muito longos.

A capacidade de floculação de minerais de biodegradação microbiana é considerada um dos processos básicos na descontaminação do solo e da água, de acordo com Thieme e colaboradores (2003). Eles usaram MET de raios X para estudos tomográficos em 3D, *in situ*, de bactérias agregadoras de partículas de solo, usando como fonte de raios X a radiação sincrotrônica. O resultado obtido por eles foi imagem tridimensional e de alta resolução.

Brownlow e colaboradores (2006) desenvolveram um microscópio de raios X com imagem de contraste de fase acoplado a um MEV, que eles denominaram "X-ray ultraMicroscope" (XuM), que atua por flexão ou refração dos raios X, à medida que eles interagem com a amostra. Além de fornecer um mecanismo para fazer imagem de materiais de baixa densidade, o contraste de fase é sensível a características de freqüência espacial alta, definindo melhor os limites de ligações, rachaduras e espaços vazios, como bolhas. Para isso, foram feitos estudos, em que avanços na fonte de raios X, tecnologia de detector e *softwares*, possibilitaram ultrapassar muitas das limitações anteriores da técnica, que tinham resolução máxima de 100 nm, passando a obter resolução de 50 nm. Ainda segundo esses autores, os raios X típicos se baseiam no contraste de absorção, mas é possível formar imagem com adaptações precisas feitas na origem dos raios, obtendo-se tanto informações de contraste de fase quanto de absorção. Para conseguir alta resolução, eles tiveram que fazer adaptações no MEV, assim como modificações no sistema de captação de imagem (câmaras CCD).

Essa técnica tem sido útil para estudar a influência de minerais na formação de biofilmes e na manutenção da estabilidade destes. Em microbiologia de alimentos, a técnica ainda é pouco utilizada, talvez porque não seja bastante conhecida. De acordo com Browlow e colaboradores (2006), o XuM permite realizar estudos de eletromigração, delaminação e localização de defeitos em semicondutores e amostras microeletrônicas, compósitos poliméricos, defeitos em diamantes e outros minerais, estudo da estrutura interna da madeira, papel e outros tipos de embalagens, exame de ampla gama de amostras biológicas e a localização de poeira cósmica capturada em aerogel. Os métodos de tomografia e estéreo ajudam muito quando se interpreta a estrutura 3D da amostra.

Para mais informações sobre microscopia eletrônica de raios X, consultar o site que contém, entre outros, sugestões de livros sobre o assunto, com ênfase em biologia (GOOGLE SCHOLAR, 2007).

2.2.4. Microscopia de Força Atômica

Há muito vinha sendo um desafio conciliar a alta resolução da microscopia eletrônica com a capacidade de obter imagens em meio aquoso, própria dos microscópios ópticos. No entanto, no início da década de 1980, com a invenção do microscópio de tunelamento (BINNIG et al., 1982), tornou-se possível observar, medir e manipular átomos ou moléculas, estimulando inúmeros laboratórios a desenvolver experimentos controlados em escala nanométrica. A invenção desencadeou o surgimento de grande variedade de técnicas microscópicas de varredura por sonda, dentre as quais se destaca, além da própria microscopia de tunelamento, a microscopia de força atômica. O MFA é um equipamento utilizado para obter imagens de superfícies de materiais diversos em escala submicrométrica, e seu funcionamento se baseia na medida de forças atrativas ou repulsivas entre a amostra e uma sonda (ponteira ou ponta) que a percorre (BINNIG et al., 1986).

2.2.5. Princípio de Funcionamento dos MFA

Os MFA sondam a superfície da amostra por meio de uma ponteira muito fina, cuja curvatura da extremidade inferior pode ser descrita aproximadamente como uma semi-esfera com raio variando entre 5 e 50 nm e comprimento entre 2 e 4 μm. As ponteiras são montadas nas extremidades livres de alavancas (*cantileveres*) com 85 a 320 μm de comprimento e módulo elástico entre 0,02 e 17 $N.m^{-1}$.

O sistema é composto basicamente por uma sonda (ponteira com extremidade inferior muito fina) fixada na extremidade de uma haste flexível (cantilever); um sistema piezoelétrico de varredura para movimentar a amostra ou a ponta; um sistema de detecção do movimento da haste; um sistema de realimentação para controlar

a distância entre a ponta e a superfície da amostra. Há duas maneiras de percorrer a amostra em observação. Tanto se pode mover a amostra e manter fixa a ponteira quanto, alternativamente, mover a ponteira sobre a amostra fixa.

As forças de interação entre a ponta e a amostra causam deflexão no *cantilever,* enquanto a ponteira percorre a amostra ou quando a amostra se desloca sob a ponteira. Em geral, os MFA são capazes de medir deflexões do *cantilever* (d_c) de até 0,01 nm. Para isso, a maioria dos MFA dispõe de um dispositivo óptico de fácil manuseio, capaz de alcançar uma resolução comparável à de um interferômetro (ALEXANDER et al., 1989). O dispositivo óptico é formado por um laser, um espelho (parte superior do *cantilever*) e um sensor de posicionamento vertical (fotodetector). O feixe de laser, após refletir na parte espelhada do *cantilever*, incide no fotodetector. Os sinais provenientes do fotodetector, que monitora o posicionamento vertical da ponta e do sistema de controle do piezelétrico, são armazenados e processados por um microcomputador, permitindo-lhe gerar um mapa topográfico da superfície em estudo.

O MFA funciona medindo forças atrativas ou repulsivas entre a ponteira e a amostra. No *modo repulsivo*, também chamado de *modo de contato*, a ponta "toca" suavemente a superfície da amostra, medindo forças de repulsão. Esse modo de operação fornece informação topográfica com definição horizontal inferior a 0,1 nm e definição vertical menor do que 0,01 nm. Uma variação do *modo de contato* que produz imagens a partir de deflexões laterais (torções) do *cantilever* recebe a denominação "microscopia de força lateral".

Outra força geralmente presente durante a operação do MFA, ao ar, no *modo de contato*, é a força de capilaridade. Superfícies expostas ao ar ambiente geralmente se acham cobertas por uma fina camada de água. Ao entrar em contato com a superfície, a sonda é envolvida pela água, e forma-se um menisco entre a ponta e a superfície, responsável por uma força atrativa intensa ($\sim 10^{-8}$ N) que os mantém em contato. A força de capilaridade resulta da separação entre a ponta e a amostra.

Operando no *modo de contato*, o MFA pode gerar imagens da superfície de duas formas distintas.

No primeiro caso, *modo de alturaconstante*, a variação espacial da deflexão do *cantilever* pode ser usada diretamente para gerar o conjunto de dados topográficos, porque a altura do *scanner* é predeterminada e mantida constante durante todo o processo de varredura. O *modo de alturaconstante* é freqüentemente usado para capturar imagens em escala atômica de superfícies absolutamente planas (Figura 3). Esse modo de operação é essencial para o registro em tempo real de imagens de superfícies dinâmicas, quando alta velocidade de varredura é imprescindível.

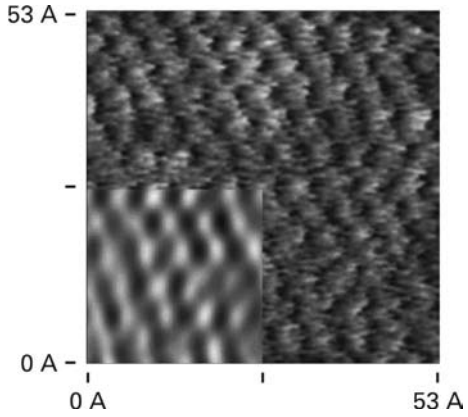


Figura 3. Resolução da rede atômica de uma superfície de mica imersa em água, obtida com velocidade de varredura de 100 nm.s-1. No destaque, a transformada de Fourier da imagem (Fonte: CEOTTO et al., 1999).

No outro caso, *modo de força-constante*, a deflexão do *cantilever* é usada como entrada de um circuito de retroalimentação que move o *scanner* para cima e para baixo, acompanhando a topografia da superfície da amostra, mantendo a deflexão do *cantilever* constante (força constante). Nesse caso, a imagem é gerada a partir do movimento do *scanner*. Como a deflexão é mantida constante, a força total aplicada à amostra também o é. No *modo de força-constante,* a velocidade de exploração é limitada pelo tempo de resposta do circuito de retroalimentação, mas a força total exercida na amostra pela ponteira é bem controlada. Na Figura 4 são apresentadas imagens do fungo *Colletotrichum graminicola*, obtida no *modo de força-constante*.

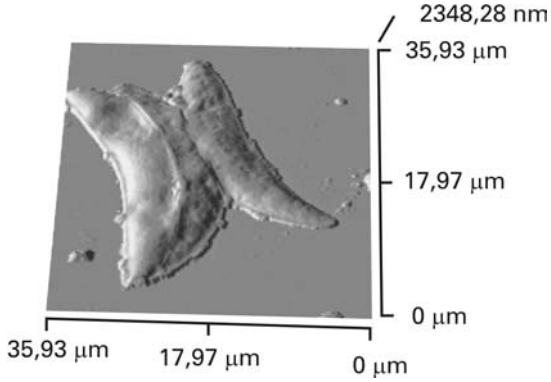


Figura 4. Imagem de fungos *Colletotrichum* graminicola em superfície de vidro (Fonte: CEOTTO et al., 1998).

No modo atrativo, ou modo de não-contato, o MFA mantém a ponta e a amostra separadas por uma distância previamente ajustada (10 - 20 nm), enquanto monitora deflexões decorrentes de interações de longo alcance, como forças de van der Waals, elétricas e magnéticas, dentre outras. Uma das vantagens desse modo de operação repousa no fato de a ponta não tocar a amostra. Entretanto, a resolução é normalmente pobre, sendo raramente usado em materiais biológicos.

O modo de contato intermitente é similar ao modo de não-contato, exceto pelo fato de que o cantilever oscila de tal maneira que, ao final de seu curso (~100 nm), a ponteira toca a amostra. Algumas amostras são mais bem exploradas através do emprego desse modo de contato, que tem se consolidado como uma técnica importante de MFA por superar algumas das limitações dos modos de contato e de não-contato. Comparado ao modo de contato, o modo de contato-intermitente elimina os danos provenientes das forças laterais (fricção ou arrasto) entre a ponta e a amostra. No entanto, para que a ponteira possa penetrar e sair da camada de água, a força vertical deve ser grande o bastante para superar a força de capilaridade (~10^{-8} N), que tende a manter a ponteira aderida à amostra, podendo danificar e, ou, deformar superfícies macias ou materiais elásticos. Em relação ao modo de não-contato, o modo de contato-intermitente tem-se mostrado mais eficaz para varrer amostras que apresentem grande variação de topografia.

A utilização do MFA permite observar materiais ao ar, em vácuo e em meio líquido. Um dos aspectos mais atrativos do MFA está exatamente na capacidade de obtenção de imagens de estruturas em soluções aquosas. Apesar de a maioria dos experimentos ainda serem realizados ao ar, os estudos em líquidos apresentam a vantagem de eliminar o menisco sem a necessidade da utilização de sistemas de vácuo, possibilitando reduzir de 10 a 100 vezes a força aplicada pela ponta à superfície (WEINSENHORN et al., 1989).

Entre as aplicações do MFA, destaca-se seu potencial de uso para o estudo de materiais biológicos (BUSTAMANTE et al., 1994; GUNNING et al., 1996; TESCHKE; DOUGLAS, 1997; HANSMA, 1998; CABALLIDO-LOPEZ; ERRINGTON, 2003; O'HAGAN et al., 2004; BERDYYEVA et al, 2005; BURTON; BHUSAHAN, 2006; JENA, 2006; PUECH et al., 2006; SIMON; DURRIEU, 2006; VENKATARAMAN, 2006). Uma vez que a maioria desses materiais é desnaturada quando não mantida em soluções isotônicas e que organismos vivos dependem do fornecimento de diversos nutrientes em forma de solutos, fica evidente a importância do desenvolvimento de mecanismos de observação de processos em sistemas imersos em meios líquidos. Nesse campo, o MFA apresenta grandes vantagens em relação a outros métodos de microscopia.

No caso particular de observações de estruturas microbianas, por exemplo, a microscopia óptica convencional apresenta limitações, pois, além de exigir o uso de substratos transparentes, a resolução fica limitada a aproximadamente metade do comprimento de onda da luz, ou seja, entre 200 e 400 nm. Já em microscopia eletrônica, ainda que o limite de resolução do microscópio óptico tenha sido superado, as amostras necessitam de preparação especial, que envolve fixação química, desidratação e emprego de contrastes ou revestimentos, o que leva à visualização de estruturas artificiais. Ao se observarem células ou esporos aderidos em superfícies, por meio de MFA, não há necessidade de luz nem de preparo prévio da amostra e, ainda, podem-se usar substratos opacos, bastando que a superfície em exame seja

plana. Entretanto, cuidados especiais devem ser tomados no preparo de materiais biológicos, a fim de evitar que materiais viscosos, como meios de cultivo à base de ágar, mascarem a imagem e inviabilizem a ponteira.

2.2.6. Curvas de Força

O MFA também permite a construção de curvas de força em função da distância entre a ponta e a superfície da amostra (CEOTTO et al., 2001). Essas medidas são essenciais para definir forças verticais que devem ser aplicadas a uma superfície, para a captação de imagens.

O MFA, além de mapear as superfícies em estudo com uma resolução espacial de poucos nanômetros, possibilita, a partir das imagens geradas, escolher onde medir as referidas forças. Se um cantilever de baixa constante elástica for usado por exemplo, com kc = 0,03 N/m, a resolução da força na direção perpendicular à superfície será:

$$F = kc \times dc = (0{,}03\ Nm^{-1}) \times (0{,}1 \times 10^{-10}\ m) = 3 \times 10^{-13}\ N$$

A representação gráfica da força aplicada à ponteira do MFA, enquanto a amostra é aproximada e afastada, constitui a chamada "curva de força". As curvas de força são complexas e específicas para diferentes sistemas em estudo. Em princípio, tal gráfico expressa a força requerida para atingir certa profundidade de deformação, o que possibilita a determinação de parâmetros viscoelásticos de materiais. Assim, se examinam plaquetas, bactérias e células, ou se estudam propriedades micromecânicas de ossos e de outros materiais.

3. Aplicação da Microscopia no Estudo da Adesão e Formação de Biofilmes

3.1. Microscopia de Força Atômica

Há cerca de 60 anos, a microscopia óptica foi usada pelo pesquisador Zobbel, para demonstrar o papel da adesão bacteriana na formação de depósitos e corrosão de superfícies sólidas submersas no mar. Esse pesquisador mostrou a capacidade de microrganismos aderirem a lâminas de vidro que foram coradas e observadas no microscópio óptico. A estrutura complexa do biofilme já foi revelada por essa técnica e, com base nas características morfológicas, uma variedade de bactérias foi descrita, indicando alta diversidade de espécies nos processos de adesão microbiana e formação de biofilmes (WIMPENY, 2000).

Hoje se vê que a microscopia pode ser empregada no estudo do processo de formação do biofilme em diversos tipos de materiais utilizados na indústria de alimentos. As técnicas se aplicam para o estudo de diferentes fases, desde a adesão,

passando pelo início da formação de camadas bacterianas (agregação), estabelecimento da arquitetura do biofilme, liberação de células para a colonização de outros sítios, estabelecimento de formas irreversíveis do biofilme (com a presença de agentes cimentantes, como o cálcio) até o estudo do papel de fímbrias e exopolissacarídeos na arquitetura do biofilme. A microscopia pode também ser utilizada para o estudo dos efeitos de cada superfície experimental e de agentes sanitizantes sobre o biofilme. Entretanto, para cada estudo sempre haverá uma técnica de microscopia mais adequada. Como exemplo, as microscopias de luz, com exceção da MFA, só se aplicam ao estudo da formação de biofilme em cupons transparentes, enquanto a MFA e a MEV são usadas no estudo das superfícies e arquitetura dos biofilmes. Já a MET e a também a MEV são aplicáveis ao estudo de exoplissacarídeos e elementos químicos envolvidos na formação do biofilme. A MET, além do já mencionado, permite o estudo da estrutura interna do biofilme e da influência de fímbrias, flagelos e glicoproteínas em sua formação. As características de algumas técnicas de microscopia são detalhadas na Tabela 1. Constata-se que o microscópio óptico e o microscópio de força atômica são rápidos e fáceis para uso, com nenhuma ou pouca preparação da amostra, não sendo necessário o uso de vácuo. Além disso, esses microscópios têm campos de observação amplos, ainda que somente o MFA tenha elevada capacidade de ampliação e resolução. Os MEV e MFA mapeiam as superfícies e têm uma profundidade de campo ampla, mas somente a microscopia de força atômica funciona com um mínimo de preparação da amostra.

Quadro 1 - Características de algumas técnicas microscópicas para avaliar microtopografia de superfícies

	Luz	Eletrônica	Força atômica
Ambiente de operação	Ar, líquido, vácuo	Vácuo	Ar, líquido, vácuo
Profundidade do campo	Pequena	Grande	Média
Profundidade do foco	Média	Pequena	Não se aplica
Resolução X Y Z	1,0 μm NA	5,0 nm NA	0,1-1,0 nm 0,01 nm
Faixa de ampliação	1x até $2x10^3$x	10x até 10^6x	$5x10^2$x até 10^8x
Preparação da amostra	Fácil	Criofixação, cobertura metálica	Nenhuma
Características requeridas da amostra	Amostra deve ser transparente para o comprimento de onda usado	A superfície deve ser compatível com vácuo	A amostra não deve apresentar excessiva variação na altura da superfície

Deve-se considerar também que, apesar de as técnicas microscópicas terem levado a uma grande quantidade de informações sobre processos de adesão microbiana e formação de biofilme, permanecem alguns problemas que devem ser levados em consideração, dentre eles a interpretação das imagens produzidas, dependendo dos procedimentos utilizados. Por exemplo, o exopolissacarídeo que geralmente cerca e envolve as comunidades microbianas pode secar, formando cordões finos, os quais podem ser interpretados como estruturas fibrosas que unem os microrganismos (WIMPENY, 2000).

A microscopia óptica convencional é o método mais simples de usar, porém possui limitações: i) a ampliação e a resolução não são tão boas quanto as de outros instrumentos mais modernos disponíveis; ii) a profundidade de campo que pode ser visualizada é mínima; iii) deve ser utilizado um substrato transparente, como o vidro; e iv) as células aderidas devem ser coradas. Apesar disso, inúmeras pesquisas com biofilmes microbianos foram realizadas, utilizando esse instrumento e, assim, é reconhecido que o microscópio de luz é um instrumento útil para estudar os biofilmes. Outras formas de microscopia de luz, como a de epifluorescência e a confocal, são os métodos preferidos para serem utilizados nessas pesquisas (ZOTTOLA, 1997).

Após essas considerações, serão mostrados subseqüentemente exemplos da utilização das diversas microscopias e esclarecidas para quais finalidades cada uma se aplica melhor.

3.2. Uso da Microscopia de Força Atômica na Avaliação de Adesão de Microrganismos e Análise de Rugosidade de Superfícies

3.2.1. Avaliação de Adesão de Microrganismos

Um breve ensaio do uso MFA para observar materiais biológicos foi desenvolvido, usando-se esporos de *Bacillus cereus* e células vegetativas de *Bacillus subtilis* e *Listeria innocua* (Tabela 2).

As estruturas desses microrganismos foram examinadas quando estes se encontravam aderidos em cupons de mica, silício e vidro. As observações foram feitas à temperatura ambiente, sendo as imagens obtidas de acordo com três diferentes protocolos de preparação das amostras: i) os cupons de mica foram clivados imediatamente antes de receber a suspensão bacteriana, com o objetivo de obter superfícies limpas e hidrofílicas, e os cupons de silício foram mergulhados em solução de ácido fluorídrico por cerca de 1 minuto, para que as superfícies se tornassem hidrofóbicas e, em seguida, lavadas em água Milli-Q. Logo após, os cupons foram impregnados por gotejamento com suspensões de esporos de *B. cereus* ($> 10^9$ esporos.mL^{-1}); ii) os cupons esterilizados de vidro e de silício foram simultaneamente colocados, por aproximadamente 18 horas, em frascos contendo 100 mL de meio

de cultivo inoculados com *B. subtilis*, sendo depois lavados com água bidestilada para remoção de células planctônicas e secos por aproximadamente 48 horas, à temperatura ambiente e em ambiente asséptico; e iii) cupons de vidro foram imersos em suspensões de células de *L. innocua* e, após 12 e 18 horas de contato, foram removidos e lavados com água bidestilada, de forma a manter somente as células sésseis. Os cupons foram observados imediatamente após a secagem.

Quadro 2 – Síntese do estudo que avaliou a adesão bacteriana em superfícies, por microscopia de força atômica (MFA)

Microrganismos	Esporos de *Bacillus cereus* e células vegetativas de *Bacillus subtilis* e *Listeria innocua*
Superfícies (Cupons de prova)	i) mica, disco, com 1 cm de raio ii) silício: disco, com 1 cm de raio iii) vidro: quadrado, com 1 cm de lado
Método de avaliação da adesão (Segundo três diferentes protocolos de preparação das amostras)	i) As superfícies dos cupons de mica e silício foram inoculadas por gotejamento, com suspensões $>10^9$ esporos/mL de *B.cereus* ii) Os cupons de vidro e de silício foram simultaneamente inoculados com *B. subtilis*, lavados e secos por aproximadamente 48 horas, à temperatura ambiente e em ambiente asséptico iii) Os cupons de vidro imersos em suspensões de células de *L. innocua*, observados imediatamente após a secagem Em todos os casos, os cupons foram lavados com água destilada e deixados secar em ambiente asséptico, à temperatura ambiente
Obtenção de fotomicrografias da adesão	Por ensaio, utilizando-se MFA, sendo a adesão observada ao ar
Delineamento experimental	Como o propósito deste estudo foi realçar as possibilidades oferecidas pelas técnicas de MFA, os resultados são as imagens, exibidas sem dados numéricos
Análises dos resultados	As imagens de estruturas microbianas foram obtidas com excelente qualidade, confirmando o potencial do MFA, para visualização e estudo da formação de biofilmes microbianos

Fonte: Ceotto Filho, 2001.

As imagens das estruturas microbianas confirmaram o potencial do MFA para visualizar e estudar materiais biológicos, evidenciando-se sua indicação para investigar mecanismos de adesão de esporos e formação de biofilmes microbianos.

Na Figura 5 são apresentadas as imagens de *L. innocua* obtidas no modo de contato, ao ar, com as células em forma de bastonete aderidas a cupom de vidro, possivelmente em plena divisão celular.

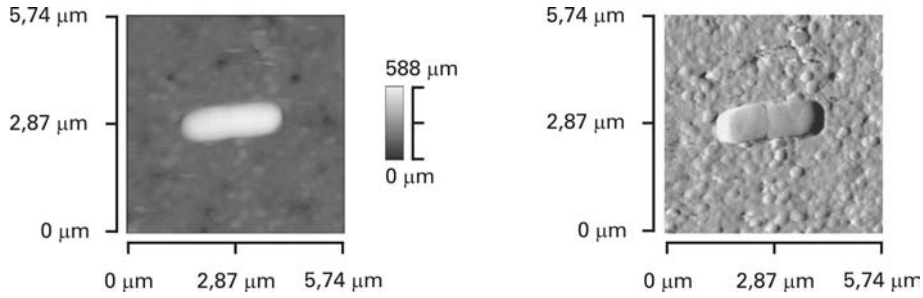


Figura 5. Imagens de *Listeria innocua* obtidas no modo de contato, ao ar. Vista de topo (a) com representação em função da altura e (b) com "iluminação" lateral (Fonte: CEOTTO, 2001).

Nas Figuras 6, 7, 8 e 9 são apresentadas as imagens de células de *B. subtilis* aderidas a cupons de vidro e de silício, também obtidas no modo de contato ao ar.

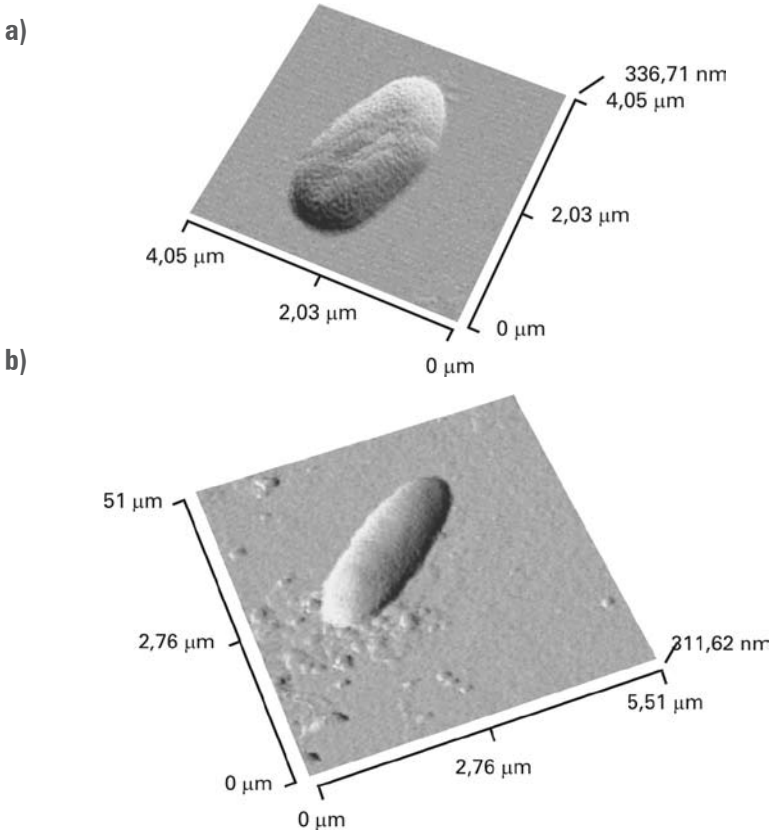
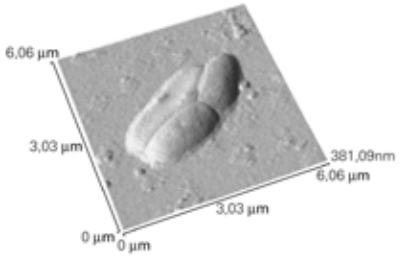


Figura 6. Imagens de células de *Bacillus subtilis* aderidas em cupons de (a) silício e (b) vidro, obtidas no modo de contato, ao ar (Fonte: CEOTTO, 2001).

a)



b)

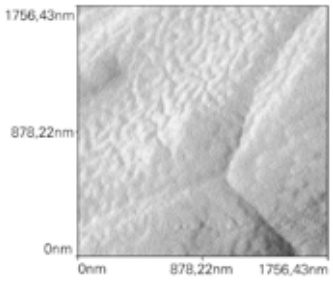
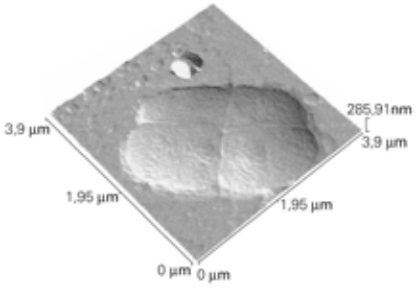


Figura 7. Imagens de células de *Bacillus subtilis* aderidas em cupom de vidro, obtidas no modo de contato, ao ar (a). Em (b), detalhe da região de contato entre células (Fonte: CEOTTO, 2001).

a)



b)

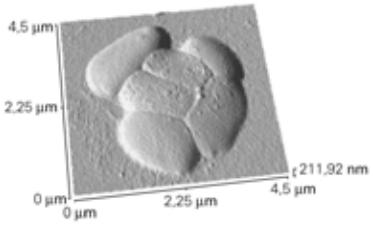


Figura 8. Imagens de aglomerados de células *Bacillus subtilis* aderidas em cupons de vidro, ao ar, obtidas no modo de contato (a) e não contato (b) (Fonte: CEOTTO, 2001).

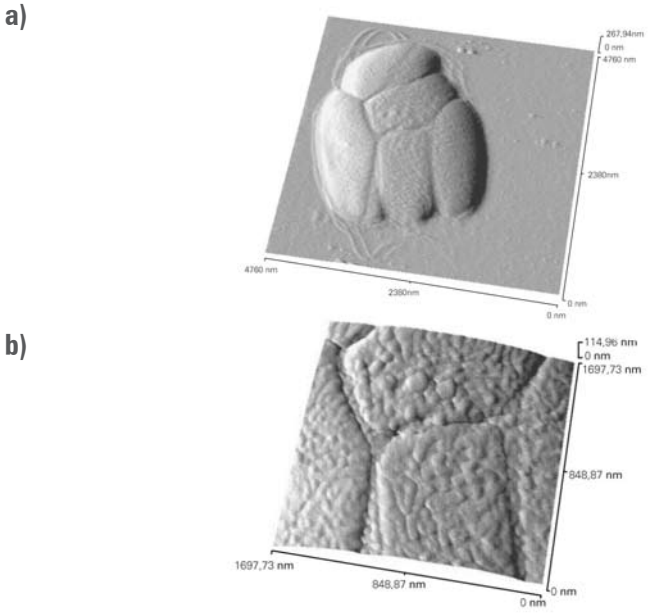


Figura 9. Imagens de aglomerado de células de *Bacillus subtilis* aderidas cupons de silício, ao ar, obtidas no modo de contato (a). Em (b), detalhes da superfície rugosa e da região de contato entre células (Fonte: CEOTTO, 2001).

As Figuras 10 e 11 exibem imagens de esporos de *B. cereus*, em cupons de mica e de silício.

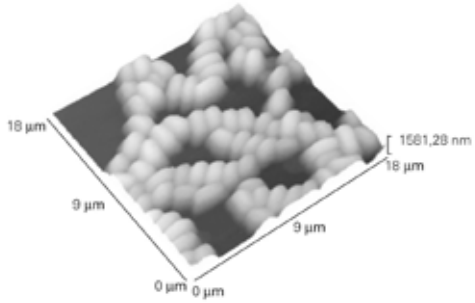


Figura 10. Imagens de esporos de *Bacillus cereus* em cupons de mica, obtidas no modo de contato, ao ar (Fonte: CEOTTO, 2001).

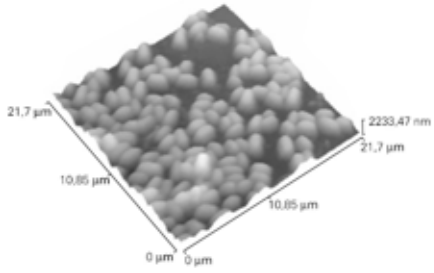


Figura 11. Imagens de esporos de *Bacillus cereus* em cupons de silício tratado com solução de ácido fluorídrico, obtidas no modo de contato, ao ar (Fonte: CEOTTO, 2001).

Na Figura 12a são mostrados detalhes da superfície de uma amostra preparada para ser visualizada por MEV. Na Figura 12b, observa-se a superfície de um esporo de *B. cereus* no estado natural, condição apropriada para visualização por MFA. As imagens revelam diferenças marcantes entre a amostra sem preparação prévia e a que foi recoberta por uma camada de aproximadamente 15 nm de ouro.

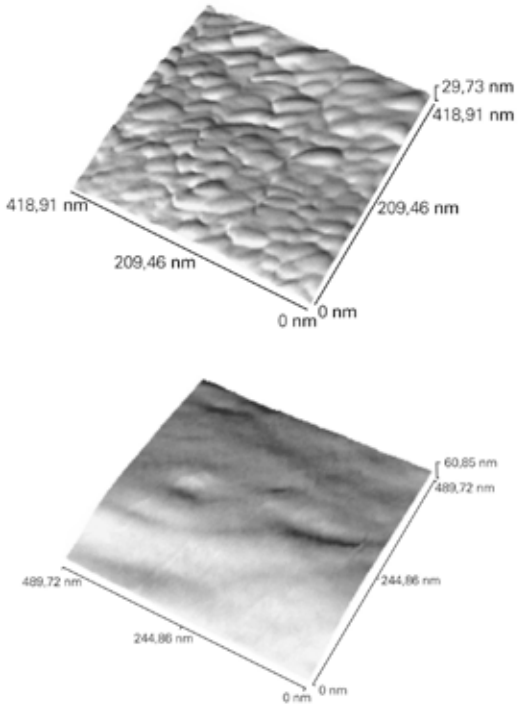


Figura 12. Imagens de superfícies de esporos de *Bacillus cereus* obtidas no modo de contato, ao ar: (a) coberto por uma fina camada de ~15 nm de ouro e (b) *in natura*.

3.2.2. Topografias de Poli-náilon Polietileno e Poli(cloreto de vinilideno) Irradiadas com ^{60}cobalto

Avaliadas pela MFA, as superfícies mostraram diferenças em suas microtopografias com o aumento do grau de irradiação (Figuras 13,14 e 15), auxiliando, assim, a interpretação da adesão bacteriana (SILVA, 2006). Embora, visualmente, possam constatar fendas identificadas pela tonalidade de cor MFA permite a determinação da rugosidade das superfícies a partir dos valores de Ra, RZ e Rq (Quadro 3), o que torna mais precisa a avaliação dos resultados.

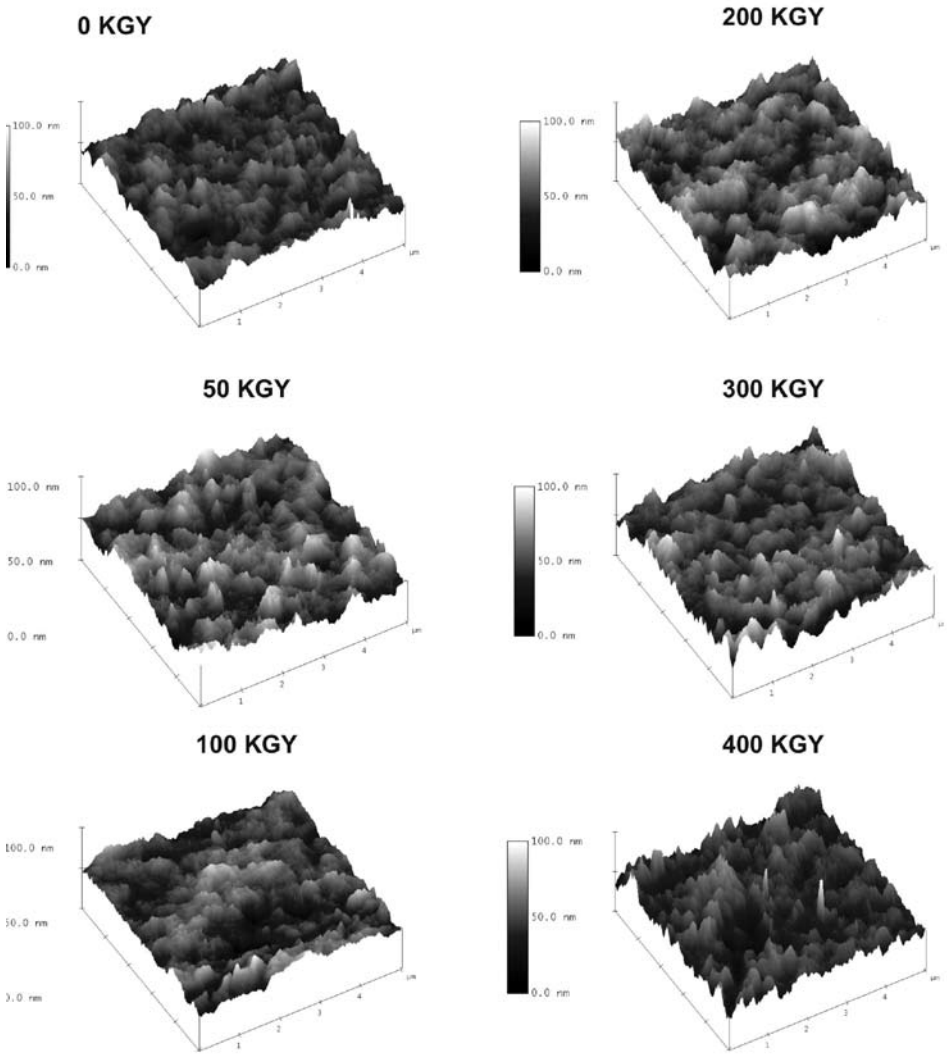


Figura 13 - Microtopografia de poli-náilon observada por microscopia de força atômica, depois de irradiado com ^{60}cobalto.

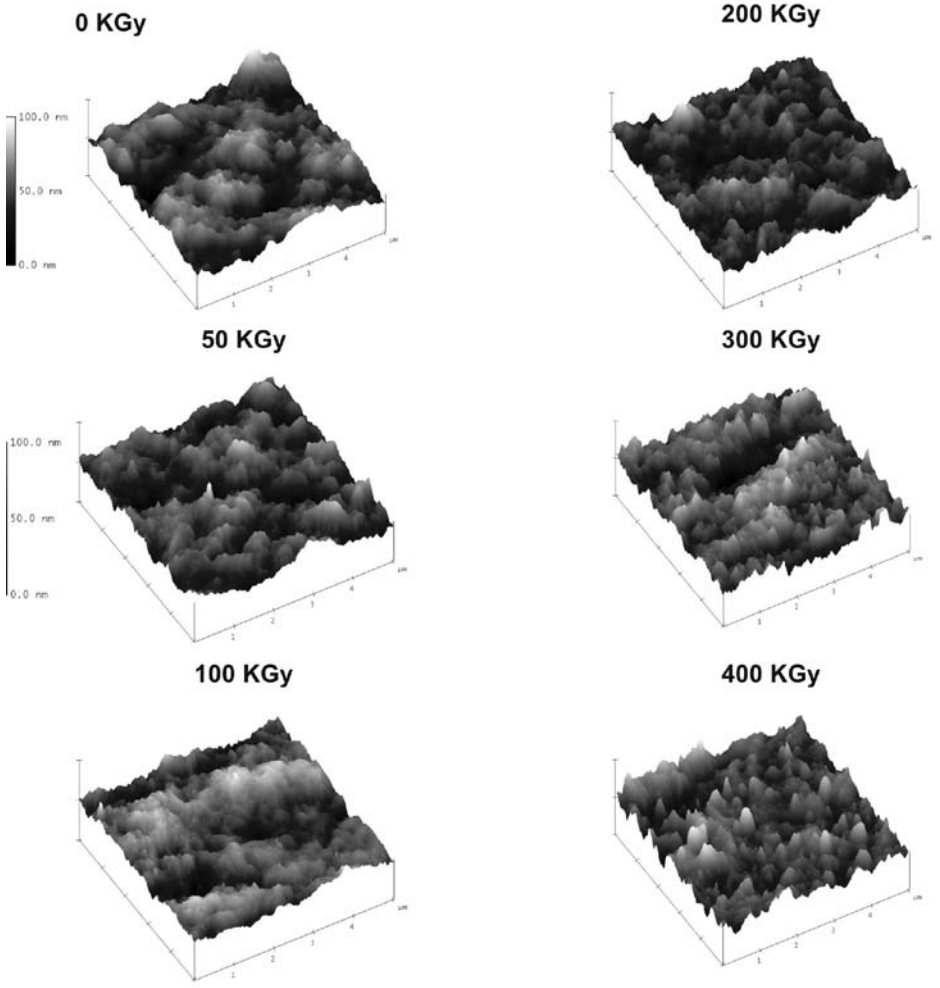


Figura 14 -. Microtopografia de polietileno de baixa densidade observada por microscopia de força atômica, depois de irradiado, com ^{60}cobalto.

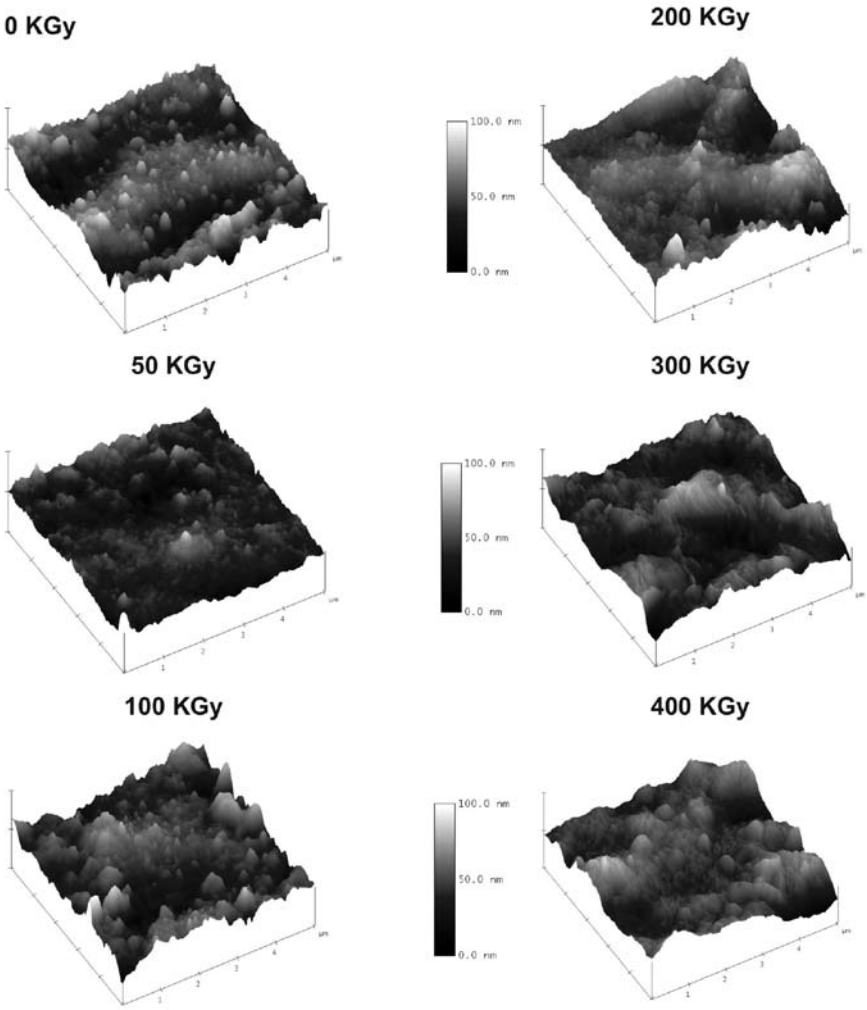


Figura 15 - Microtopografia de poli(cloreto de vinilideno) observada por microscopia de força atômica, depois de irradiado, com ^{60}cobalto.

Quadro 3 – Rugosidade média (Ra), média da raiz quadrada das rugosidades (Rq) e média dos pontos mais irregulares (Rz) das amostras de nylon-poli, PEBD e PVDC, obtidos por microscopia de força atômica, após a irradiação com ^{60}cobalto

Polímero	Grau de Irradiação	R_a (nm)	R_q (nm)	R_z (nm)
Poli-Náilon	0	8,258	10,493	109,91
	50	9,977	12,454	90,434
	100	8,559	10,739	80,632
	200	9,354	11,794	89,657
	300	10,117	13,061	105,40
	400	12,573	15,961	171,94
		52%	**52%**	**113%**
PEBD	0	11,725	14,446	104,79
	50	10,937	13,625	106,27
	100	9,119	11,513	80,345
	200	8,913	11,563	104,35
	300	12,208	15,561	117,41
	400	10,899	14,221	122,87
		36%	**35%**	**53%**
PVDC	0	14,775	18,134	126,90
	50	9,123	12,027	117,97
	100	17,388	22,298	184,87
	200	14,982	19,322	162,75
	300	20,987	26,271	178,78
	400	22,959	29,391	233,33
		152%	**144%**	**98%**

Os resultados do Quadro 3 evidenciam diferenças nas microtopografias das superfícies irradiadas. Quando são analisados os valores de Ra e Rq, verifica-se que a superfície que apresenta maiores médias de rugosidade é a PVDC, com valores variando entre 9,123 nm e 22,959 nm para Ra e entre 12,027 nm e 29,391nm para Rq, correspondendo a um acréscimo de 152 % e 144 % na rugosidade, respectivamente. Para o poli-náilon, os valores variaram de 8,238 nm a 12,573 nm para Ra e de 10,493 nm a 15,961 para Rq, perfazendo um acréscimo porcentual de 52 % nos dois parâmetros de avaliação da rugosidade. Dentre os polímeros analisados, o PEBD apresentou menor variação para Ra e Rq, respectivamente de 8,913 nm a 12,208 nm e de 11,513 nm a 15,561, com uma diferença porcentual de 36 % e 35 % na rugosidade.

Com relação às médias dos picos mais altos e mais baixos (Rz) das superfícies, pode-se destacar que o poli-náilon apresentou maior variação porcentual, 113 %, com valores de variação entre 80,632 nm e 171,94 nm, sendo seguido pelo PVDC, que apresentou valores variando de 117,97 nm a 233,33 nm. Para o PEBD, os valores variaram de 104,35,nm a 122,87 nm, com porcentual de alteração de 53 % na rugosidade do polímero.

Provavelmente, a alteração na rugosidade pela irradiação se deveu às estruturas diferentes dos polímeros.

3.3. Adesão Bacteriana em Diferentes Superfícies Avaliada pela Microscopia de Epifluorescência

As fotomicrografias da Figura 16 mostram a adesão de *S.aureus* e de *L. innocua* em aço inoxidável AISI 304, nº 4. Usando as fotomicrografias, pode-se determinar o número de microrganismos aderidos à superfície. Para o *S. aureus* são enumeradas 31 unidades microbianas (isoladas ou em agrupamento) em uma área de 2160 μm^2. Assim, em uma área de 1 cm^2, tem-se a adesão de 7,8 $x10^4$ CDM/cm^2, configurando-se um proceso de adesão. Da mesma forma, observam-se 16 unidades de *L. innocua* aderidas a uma área de 2160 μm2 do aço inoxidável, sginificando uma adesão de 3,9 $x10^4$ CDM/cm^2.

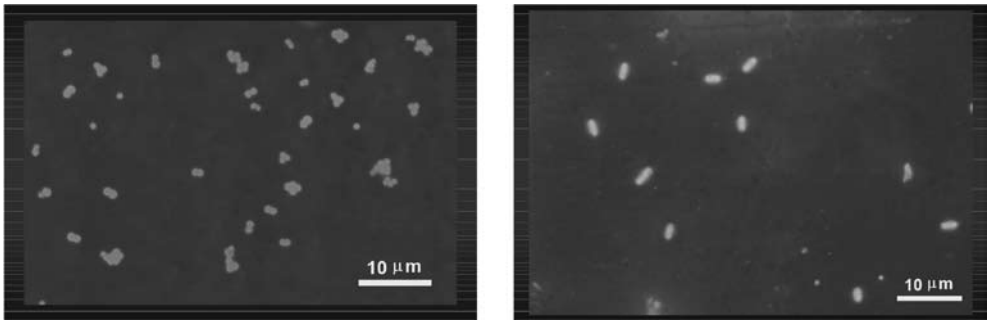


Figura 16 - Adesão de *Staphylococcus aureus* e de *Listeria innocua* em aço inoxidável AISI 304, nº 4, após 12 h, a 37 ºC.

Na Figura17, observa-se um biofilme de *P. fluorescens* em polietileno após 12 h de adesão.

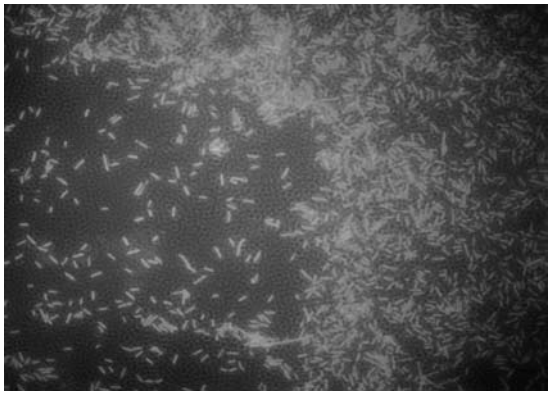


Figura 17 - Biofilme de *Pseudomonas fluorescens*, em polietileno, após 24 h a 30 °C.

A fotomicrografia da Figura 19 mostra a adesão de esporos de *Bacillus cereus* em polietileno, onde se pode observar a morfologia oval e, ou, esferica dos esporos.

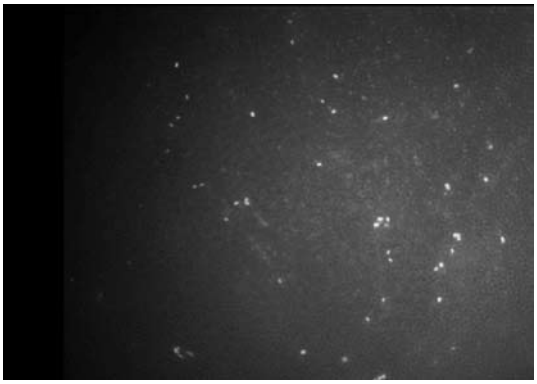


Figura 19 - Adesão de esporos de *Bacillus cereus* em polietileno, após 12 h a 30 °C.

As fotomicrografias da Figura 20 mostram a adesão de *Pseudomonas fluorescens* a diversas superfícies e tempos de contato.

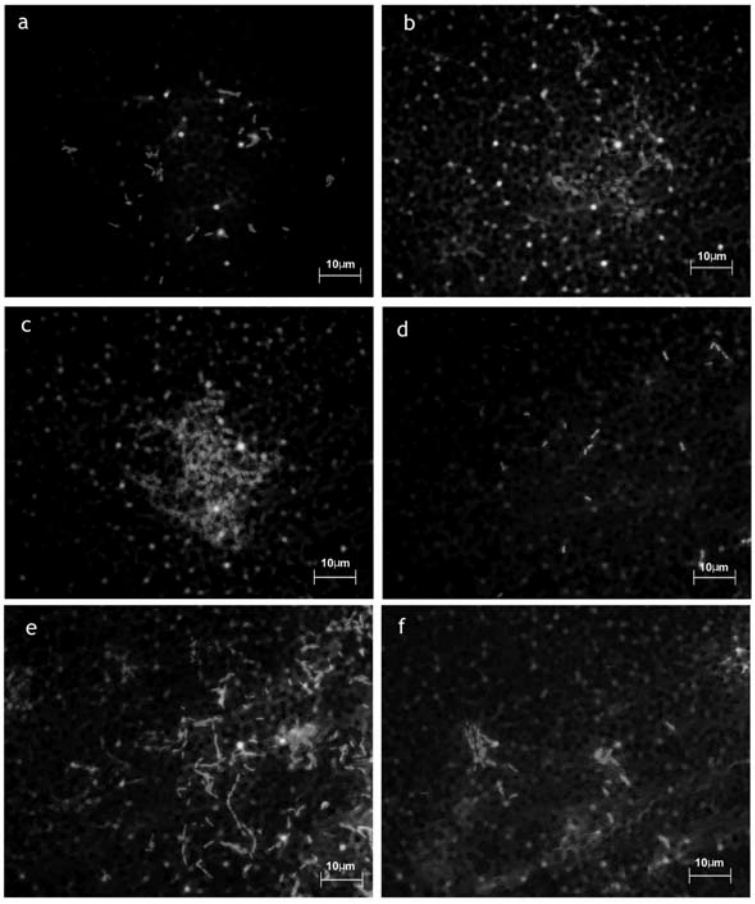


Figura 20 - Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em diversas superfícies e tempos de contato: a- aço inoxidável(6 h); b- PVC revestimento fino (10 h); c- PVC revestimento grosso (8 h); d- granito (2 h); e- mármore (8 h); f- poliuretano dupla face (6 h).

3.4. Adesão Bacteriana e Formação de Biofilmes Observada pela Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias mostram a adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em superfícies de folhas de alface.

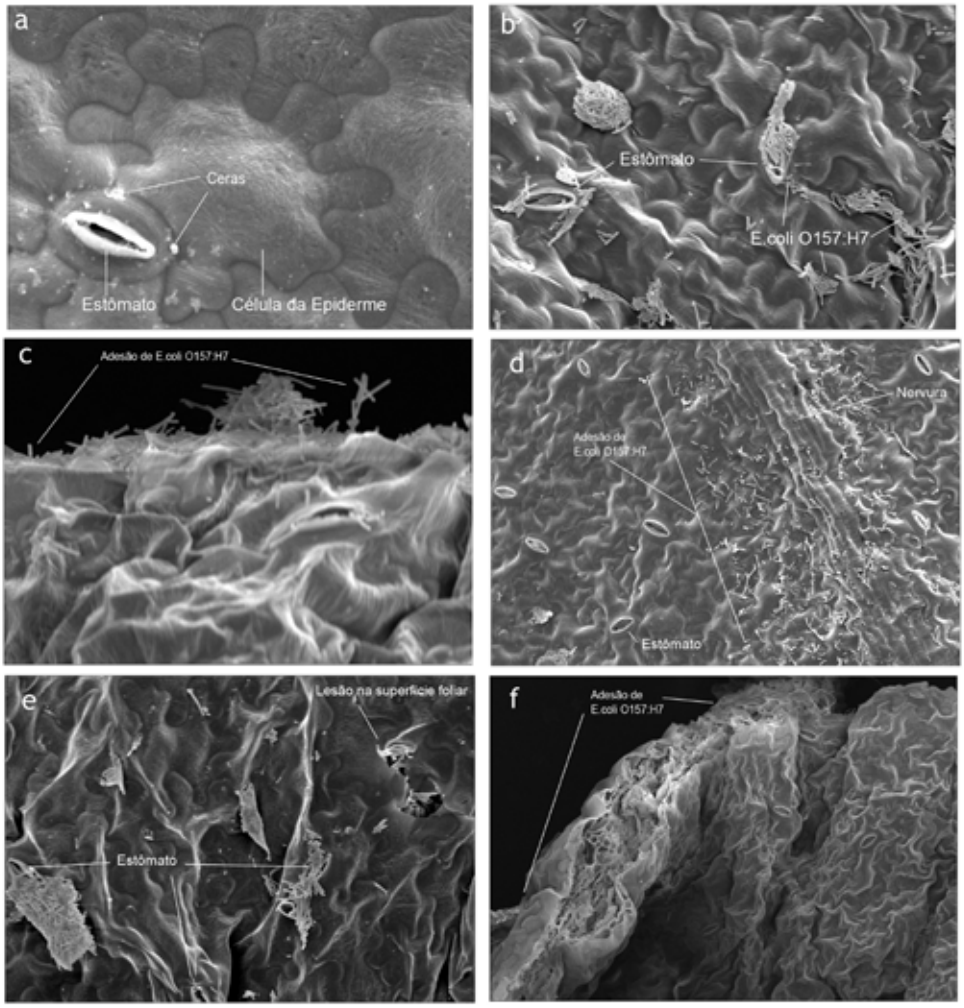


Figura 21 - Adesão de *Escherichia coli* O157:H7 superfícies de alface, avaliada por microscopia de força atômica.

3.5. Avaliação de Superfície de Aço Inoxidável por MFA

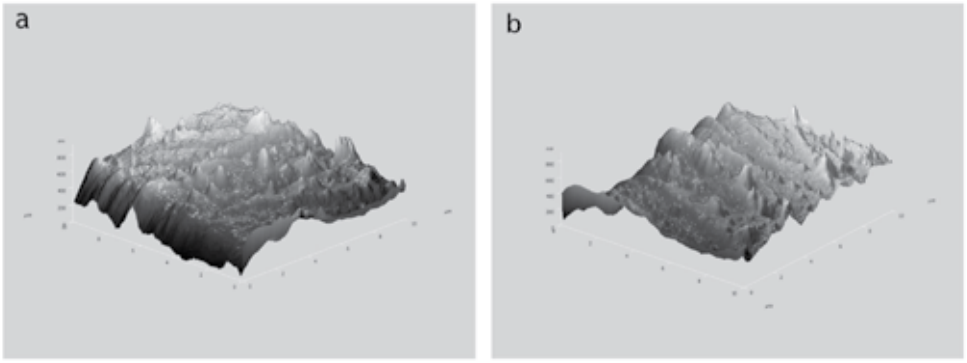


Figura 22 - Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável AISI 304 nº4, por microscopia de força atômica.

4. Conclusão

Há cerca de 60 anos, a microscopia foi usada pelo pesquisador Zobbel para demonstrar o papel da adesão bacteriana na formação de depósitos e corrosão de superfícies sólidas submersas no mar. Esse pesquisador mostrou a capacidade de microrganismos de aderirem à lâminas de vidro, que foram posteriormente coradas e observadas ao microscópio. A estrutura complexa do biofilme foi revelada por essa técnica. Com base nas características morfológicas, concluiu-se que grande diversidade de espécies contribuía para os processos de adesão microbiana e formação de biofilmes naquelas superfícies.

Hoje se vê que a microscopia pode ser empregada no estudo das várias fases do processo de formação do biofilme, em diferentes tipos de cupons ou substratos utilizados experimentalmente em microbiologia de alimentos. As técnicas se aplicam aos estudos de adesão, início da formação de camadas bacterianas (agregação), estabelecimento da arquitetura do biofilme, liberação de células para a colonização de outros sítios, estabelecimento de formas irreversíveis de biofilme com a presença de agentes cimentantes, como o cálcio, até o estudo do papel de fímbrias e exopolissacarídeos na arquitetura do biofilme. A microscopia pode também ser usada no estudo dos efeitos de cada superfície experimental e de agentes sanitizantes sobre o biofilme.

Para cada desafio, entretanto, sempre haverá uma técnica de microscopia mais adequada. Como exemplo, as microscopias de luz de campo claro, quando acopladas com contraste de fase e de iluminação DIC, se aplicam ao estudo da formação de biofilme em cupons transparentes, com ou sem coloração; com fonte de luz adequada e filtros especiais, a microscopia de luz se aplica à observação de bactérias

autofluorescentes ou à fluorescência de células bacterianas marcadas, cito-esqueleto; na contagem de células bacterianas geralmente é usado o microscópio de campo escuro, enquanto o microscópio de força atômica (MFA) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) são utilizados nos estudos de superfícies e arquitetura dos biofilmes e de bactérias. No entanto, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) são muito empregadas no estudo de exopolissacarídeos e elementos químicos envolvidos na formação do biofilme. A MET, além do mencionado, permite o estudo da estrutura interna, da composição e papel fisiológico do biofilme em relação à célula bacteriana e à superfície do substrato, bem como ajudar a desvendar a influência de fímbrias, flagelos e glicoproteínas na formação do biofilme. Em termos de preparação da amostra, tanto o microscópio de luz (com exceção do de fluorescência e do confocal) quanto o MFA são rápidos e fáceis de usar, com nenhuma ou pouca preparação das amostras; os eletrônicos normalmente são usados sob alto vácuo, daí a necessidade de um processo mais longo de preparação dos espécimes biológicos. Entretanto, com relação ao tamanho da amostra, os microscópios de luz permitem vasto campo de observação, ao contrário do MFA, que no entanto, possui elevada capacidade de resolução. Os MEV e MFA mapeiam as superfícies e têm profundidade de campo ampla; embora ambos possam usar espécimes praticamente sem nenhuma preparação anterior, o MFA, todavia, trabalha apenas espécimes de dimensões micrométricas. As sondas de raios X e os microscópios de raios X não fornecem informação sobre a morfologia do material, mas informam a constituição iônica dele.

Referências

ABU-HAMDAH, R.; CHO, W.J.; HÖRBER, J.K.H.; JENA, B. P. Secretory vesicles in live cells are not free-floting but tethred to filamenous structures: A study using photonic force microscopy. **Ultramicroscopy**, 106:670-673, 2006.

ALEXANDER, S.; HELLEMANS, L.; MARTI, O.; SCHNEIR, J.; ELINGS, V.; HANSMA, P.K.; LONGMIRE, M.; GURLEY, J. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical-lever. **Journal of Applied Physics**, v. 65, n. 1, p. 164-167, jan 1 1989.

AMERSHAMBIOSCIENCES. http://www4.amershambiosciences.com/. 2007

ANALYTIC. http://www.sem.com/analytic/sem.htm .2007.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A. ; AJAO, D. B.,. ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by Enterococcus faecium. **Journal of Food Protection**, v.61, -1454-1456, 1998(a).

ANDRADE, N.J., BRIDGEMAN, T.A., ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against Enterococcus faeciuum attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal Food Protection**, v.61, p.833-838, 1998(b).

BERDYYEVA, T.; WOODWORTH, C.D.; SOKOLOV, I. Visualization of cytoskeletal elements by tne atomic force microscope. **Ultramicroscopy**, 189-198, 2005.

BINNIG, G.; QUATE, C. F; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Reviews Letters**. 56: 930-933, 1986

BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. Tunneling through a controllable vacuum gap. **Applied Physics Letters,** 40: 178-180, 1982.

BIOPHYSJ. http://www.biophysj.org/cgi/reprint/85/4/2705.pdf. 2007

BIOSTATUS. http://www.biostatus.co.uk/. 2007

BLACKMAN I., FRANK, I.F. Growth of Listeria monocytogenes as a biofilm on various food processing surfaces. **Journal Food Protection,** v.59, p.827-831, 1996.

BOZZOLA, J.J. E RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists**. 1999

BROWNLOW, L.; MAYO, S.; MILLER, P. SHEFFIELD-PARKER, J. Towards 50-nanometre resolution with an SEM-hosted X-ray microscope. **Microscopy and Analýsis**, 20(2);13-15, 2006.

BURTON, Z.; BHUSAHAN, B. Surface characterization and adhesion and friction properties of hydrophobic leaf surfaces. **Ultramicroscopy** 106: 709-719, 2006

BUSCHMANN, H. POTTER, U. Beeching, J. Ultrastruture of cassava roots studied by TEM and SEM. **Microscopy and Analysis**, 52: 17-19, 2002.

BUSTAMENTE, C.; ERIE, D.A. KELLER, D. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. **Current Opinion in Structural Biology,** 4:750-760, 1994

CABALLIDO-LOPEZ, R., ERRINGTON, J. A dynamic bacterial cytoskeleton. **Trends in Cell Biology** 13(11):577-583, 2003

CEOTTO FILHO, G. **Medidas de perfil da permissividade elétrica em interfaces sólido-líquido, usando microscopia de força atômica.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. (Tese de doutorado). 119p.2001

CEOTTO, G.; ANDRADE, N.J.; TESCHKE, O. Uso de microscopia de força atômica (AFM) na observação de células e esporos bacterianos, aderidos a superfícies. **Anais do V Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**, Águas de Lindóia, SP, nov 1998.

CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F.; DOUGLAS, R.A.; TESCHKE, O. Efeitos do tempo de relaxação da dupla camada na resolução das imagens obtidas por microscopia de força atômica. **Anais do XXII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada**, Caxambu, MG, p. 403, mai 1999.

CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F.; TESCHKE, O. Ionic surfactant films imaged by atomic force microscopy. **Journal of Molecular Catalysis A – Chemical**, v. 167, n. 1-2, p. 225-233, fev 2001.

CPG-BIOTECH. http://www.cpg-biotech.com. 2007

FIOCRUZ http://www.invivo.fiocruz.br/celula /historia_05.htm, 2007b

FORIN, E.L.; PRALLE, A.; STELZER, E.H.K.; HÖRBER, J.K.H. Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis. **Applied Physics A**, 66:S75-S78, 1998.

GLAUGHER, D. (ED.). **Scanning Electron Microscopy in Taxonomy and Functional Morphology - The Systematic Associoation Special** Volume No.41. Oxford. Clarendon Press. 1990. 315p.

GUNNING, P.A., KIRBY, A.R., PARKER, M. L., GUNNING, A..P., MORRIS, V.J. Comparative imaging of Pseudomonas putida bacterial biofilms by scanning electron microscopy and both DC contact and AC non-contact atomic force microscopy. **Journal of Applied Bacteriology**, 81 276-282. 1996

HALL, C. E. A low temperature replica method for electron microscopy. **Journal of Applied. Physics**, 21: 61, 1950

HANSMA, P.K.; ELINGS, V. B.; MARTI, O.; BRACKER. C. E. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. **Science**, 242: 209-216, 1988.

HAYAT, M. A. **Basic Electron Microscopy Techniques**. NY, Cincinnati, Chicago, Millbrae, Dallas. Van Nostrand Reinhold. 1972. 119 p.

HAYAT, M. A. **Colloidal Gold- Principles, methods, and applications**. v.1. San Diego, NY, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press. 1989. 536p.

HAYAT, M. A. **Positive Staining for Electron Microscopy**, NY, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne, Van Nostrand Reinhold, 1975. 361p.

HAYAT, M. A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications**. V.1. NY, Cincinnati, Chicago, Millbrae, Dallas. Van Nostrand Reinhold. 1970. 410p.

HELIXRESEARCH. http://www.helixresearch. com/. 2007

HEYWOOD, V. H. (ed.). **Scanning Electron Microscopy - Systematic and Evolutionary Applications**. London, NY,. Systematic Association and Academic Press. 1971. 331p.

HIBBS, A. R. Confocal Microscopy for Biologists. Melbourne. Springer. 2004, 467p.

HOOD, S. **Adherence of food-borne microorganisms to stainless steel**. Ph.D Thesis. University of Minnesota. St Paul. 1996.

ICNPHARM http://www.icnpharm.com.2007

IFR.http://www.ifr.ac.uk/spm/publications.html . 2007ª

IFR http://www.ifr.ac.uk/spm/gallery.lasso. 2007b

INVITROGEN. http://www.invitrogen.com/. 2007;

JENA, B.P.. Cell secretion machinery: studies using the AFM. **Ultramicroscopy** 106: 663-669, 2006

KPL. www.kpl.com/.2007

LEICA. http://www.leica.com. 2007

LEWIS, P. R. , KNIGHT, D. P., **Cytochemical Staining Methods for Electron Microscopy**. vol 14. (ed: Glauert, A. M. Pratical Methods in Electron Microscopy. Amsterdan, Londres, NY, Tóquio. Elsevier. 1992. 321p.

MADL, J.; RHODE, S.; STANGL, H; STOCKINGER, H.; HINTERDORFER, P.; SCHÜTZ, G.J.; KADA, G. A combined optical and atomic force microscope for live cell investigations. **Ultramicroscopy**, 8-9: 645-651,2006

MEEK, G.A. **Pratical Electron Microscopy for Biologists**, 2ed. London, NY, Sydney, Toronto, Jon Wiley et Sons, 1976. 528p.

MICROSCOPYU. http://www.microscopyu.com/articles/ confocal/index.html .2007e

MICROSCOPYU.http://www. microscopyu.com/articles/fluorescence/index.html. 2007d

MICROSCOPYU.http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html .2007c

MICROSCOPYU.http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasna.html 2007a

Microscopyu.http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasehome.html. 2007b

MICROSCOPYU.http://www.microscopyu.com/articles/stereomicroscopy/index.html 2007 f

Mobitech. http://www.mobitech.de/.2007

Muller, D.A.; Kirkland, E.J.; Thomas, M.G.; Grazul, J.L.; Fitting, L.; Weyland, M. Room design for high-perfomance electron microscopy. **Ultramicroscopy**, 106: 1033-1040, 2006.

MUSETTI, R., FAVALI, M.A. Cytochemical localization of calcium and X-ray microanalysis of Catharanthus roseus L. infected with phytoplasmas. **Micron**, 34:387-393, 2003

NEWBURY, D.E.; ECHLIN, P.; JOY, D.C.; FIORI, C.E.; GOLDSTEIN, J.I. **Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**, 1986

O´HAGAN, B.M.G.; DOYLE, P.; ALLEN. J.M.; SUTTON, K.; MCKERR, G. The effects of atomic force microscopy upon nominated living cells. **Ultramicroscopy**, 102:1-5, 2004

OLIMPUS. http://www.olympus.com.2007

PARIZZI, S.Q.F.; **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem de placas**. Editora Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 1999. 58p. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

PARSON, D. F. **Some Biological Techniques in Electron Microscopy**. NY, London. Academic Press. 1970. 186p.

PIERRI, J.J.; MAESTRELLI, S.C.; PALLONE, E. M. J. A.; TOMASI, R. Dispersão de nanopartículas de ZrO2 visando a produção de nanocompósitos de ZrO2 em matriz de Al2O3. **Cerâmica**, 51(317):jan-mar, 2005 (http://www.scielo.br/scielo .php?script=sci_arttex&pid=S0366-69132005000100003).

PORETTI, M. Quality control of water as raw material in food industry. **Food Control**, v.1. n3, p.79-83, 1990.

POSTEK, M.T.; HOWARD, K.S.; JOHSON, A. H.; McMichael, K.L. **Scanning Electron Microscopy - A Student´s handbook**. Ladd Research Industries, 1980; 305p.

PRALLE, A.; FLORIN, E. L., STELZER, E. H. K.; HÖRBER, J. K. H. Local viscosity probed bu photonic force microscopy. Applied. **Physics** A 66:S71-S73, 1998.

PROBES. http://www.probes.com. 2007

PUBMEDCENTRAL.http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1303494 . 2007

PUECH, P. H.; POOLE, K.; KNEBEL, D.; MULLER, D. J. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. **Ultramicroscopy**,106: 637-644, 2006

QBIOGENE. http://www.qbiogene.com/. 2007

RASKA, I. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. **Trends in Cell Biology**, 13:517-525, 2003

SCHOLAR.GOOGLE.http://scholar.google.com/scholar?q=X+ray,+electronic+microscopy&hl=pt-BR&lr=&start=20&sa=N . 2007

SILVA, C. A. S. **Avaliação da adesão bacteriana em polímeros empregados na indústria de alimentos irradiados com ^{60}cobalto.** Viçosa, MG. 2006. p. 56. Tese (doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa.

SIMON,A. E DURRIEU, M. C. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. **Micron**, 37:1-13, 2006

SMARDA, J.; SMAJS, D.; KOMRSKA, J.; KRZYZANEK, V. S-layers on cell walls of cyanobacteria. **Micron**, 33:257-277, 2002.

SOUZA, W. de (ed.) Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro. **Sociedade Brasileira de Microscopia**. 1998. 179p.

STANLEY, R.L.; FLECK, R.; PATTERSON-KANE, J. C.; GOODSHIP, A.E.; RALPHS, J.R. Confocal microscopy and image analysis of connexin plaques in equine tendon. **Microscopy and Analysis**, 20 (2): 5-6, 2006

TECNHNION.http://www.technion.ac.il/~eshimoni/Research.htm.2007

TERAUCHI, M.; KAWANA, M. Soft-X-ray emission spectroscopy based on TEM - Toward a total electronic struture analysis. **Ultramicroscopy**, 106: 1069-1075, 2006.

TESCHKE, O.;DOUGLAS, R. A. Viscous drag effect on imaging of linearized plasmid deoxyribonucleic acid in liquid medium with atomic force microscopy. **Applied Physics Letters**, 70;1977-1979, 1997

THIEME, J.; SCHNEIDER, G. E KNÖCHEL, C. X-ray tomography of a microhabitat of bacteria and other soil colloids with sub-100nm resolution. **Micron**, 34: 339-334, 2003

TIEDT, L R.; JOOSTE, W. J.; HAMILTON-ATTWELL, V. L. Techniques preserving aerial fungus structures for scanning electron microscopy. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 88(3): 420-421, 1987

TOTH, M.; THIEL, B.L.; DONALD, A.M. Interpretation of secondary electron images obtained using a low vacuum SEM. **Ultramicroscopy**, 94:71-87, 2003.

VAN NOORDEN, C. J. F. , FREDERIKS, W. M. **A Enzyme Histochemistry - A laboratory manual of current methods.** Royal Microscopy Society, Microscopy Handbooks, vol.26. Oxford Science Publications. 1989. 116p.

VENKATARAMAN,S.; ALLISON, D.P.; QI, H.; MORREL-FALVEY, J.L.; KALLEWAARD, N.L.; CROWE JR., J.E.; DOKTYCZ, M.J. Automated image analysis of atomic force microscopy images of rotavirus partiles. **Ultramicroscopy**, 106:829-837, 2006.

VOLDMAN, J. Electrical forces for microscale cell manipulation. **Annu. Ver. of Biomedi. Eng.** 8: 425-454, 2006

WANG, T.L. (ed.) **Immunology in Plant Science.Society foi Experimental Biology** - Seminar Serie, v.29. Cambridge, London, NY, New Rochelle, Melbourne, Sydney. Cambridge University Press. 1986. 228p.

WEISENHORN, A.L. HANSMA, P.K.; ALBRECHT, T.R.; QUATE, C.F. Forces in atomic force microscopy in air and water. **Applied Physics Letters**, 54(26): 2651-2653, 1989

WIKIPEDIA . http://en.WIKIPEDIA.org/wiki/Optical _microscope. 2007 b

WIKIPEDIA http://en.WIKIPEDIA.org/wiki/Dark _field_microscopy. 2007 c

WIKIPEDIA.http://en.WIKIPEDIA.org/wiki/Electron_microscope#Electron_microscope_manufacturers.2007d

WIKIPEDIA.http://en.WIKIPEDIA.org/wiki/Light_microscope#Limitations_of_light_microscopes.2007a

WIMPENY J.; MANZ W.; SZEWZYK U. Heterogeneity In Biofilms. FEMS Microbiology Reviews, v.24 p-661-671, 2000.

YU, F. P., MCFETERS, G. A.. Rapid in situ assesment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. **Journal of Microbiological Methods** , 20:1-10, 1994.

ZEISS. http://www.zeiss.com; www.nikkon.com.(2007)

ZOLTAI, P. T.; ZOTTOLA, E. A; MCKAY, L. L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surface. **Journal of Food Protection**, 44:204-208. 1981.

ZOTTOLA, E.A. **Special techniques for studying microbial biofilms in systems**. In: Tortorello, M.L., Grendel, S.M. (Eds.) Food microbiologist analysis: new technologies. Baltimore: IFT basic symposium, 1997

Capítulo 03

Testes em Uso Simulado para Avaliação de Processos de Adesão e Formação de Biofilmes Bacterianos

1. Introdução

2. Considerações Sobre o Sistema *Cleaning In Place* (CIP)

3. Sistema Modelo de Circulação de Leite para Estudos de Adesão Bacteriana

- 3.1. Adesão de *Enterococcus faecium* em Aço Inoxidável e sua Resistência a Agentes Químicos
- 3.2. Adesão de Células Vegetativas e de Esporos Bacterianos em Aço Inoxidável
- 3.3. Adesão de *Bacillus cereus* em Aço Inoxidável: Efeito do Fluxo e do Tempo de Adesão
- 3.4. Adesão de Esporos *Bacillus sporothermodurans* em Aço Inoxidável e sua Resistência a Agentes Químicos

4. Sistema Modelo para Avaliação de Adesão Bacteriana e Eficiência Bactericida da Radiação Ultravioleta em Polietileno de Baixa Densidade

- 4.1. Adesão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em Polietileno e sua Resistência à Radiação Ultravioleta
- 4.2. Adesão de *Bacillus stearothermophilus* ao Polietileno e Sua Resistência à Radiação Ultravioleta

5. Conclusão

6. Referências

Nélio José de Andrade
Hamilton Mendes Figueiredo
Cleusa Kyiomi Akutsu
Cristiane Mello Albuquerque
Cleuber Antônio de Sá Silva
Maria Aparecida Antunes

Os testes em uso simulado,
quando bem elaborados, refletem as condições reais
do processamento da indústria de alimentos.

1. Introdução

Os testes em uso simulado preconizam a transferência das condições de processamento na indústria de alimentos para o laboratório. Para isso, muitas vezes, é necessário desenvolver metodologias e equipamentos para simular as diversas condições dos procedimentos de higienização e dos usos dos sanitizantes. Esses testes são mais trabalhosos e exigem criatividade, e todas as condições devem ser muito bem definidas.

Há mais de um século, o descobridor do bacilo da tuberculose, Robert Koch, desenvolveu o primeiro método de teste para avaliar a eficiência de desinfetantes. Ele impregnou fio de seda com *Bacillus anthracis* e o mergulhou em solução de desinfetante por vários tempos. Observou-se que os esporos eram protegidos contra a ação do desinfetante pela proteína do meio utilizado que permaneceu no fio mesmo após a lavagem, resultando em efeito bacteriostático no meio do subcultivo. A partir de então, vários estudos foram desenvolvidos até o estabelecimento dos métodos atualmente utilizados (CREMIEUX; FLEUTETTE, 1991).

Em 1982, Scheusner inoculou *Staphylococcus aureus* e esporos de *Bacillus subtilis* em bandejas de fibra de vidro contendo resíduos de carne, leite e cereais. Após a adesão, as bandejas foram submetidas à sanitização pelos métodos *spray*, imersão e enxagüagem. Em seguida, foram imersas em solução neutralizante, sendo os microrganismos recuperados por *swab* e enumerados em meios de cultura apropriados. Segundo esse autor, o teste reproduziu as condições reais de higienização e avaliou a resistência do microrganismo à ação do sanitizante e a eficiência do processo de higienização.

Em 1985, Stone e Zottola desenvolveram um modelo em sistema *Cleaning In Place* (CIP) constituído de tubulação de aço inoxidável com 3,5 m, para a circulação de 15 L de leite desnatado inoculado com *Pseudomonas fragi*. O modelo foi acoplado a uma bomba de pressão positiva e a um tanque de equilíbrio. Verificou-se que o sistema- modelo foi adequado ao estudo da adesão do microrganismo-teste.

Em 1995, Contin e colaboradores simularam as condições de sanitização e limpeza de tubulações, elaborando um modelo em sistema CIP, por onde circularam 15 L de leite desnatado. Em cupons de prova de aço inoxidável, foram aderidos esporos de *Bacillus stearothermophilus*, sob um tratamento térmico de 62,8 °C por 30 min, com leite pasteurizado contendo 3 % de gordura ou leite adicionado de 1,25 % de suspensão, com 4,0 x 10^7 esporos por mililitro. Os processos de higienização avaliados neste

estudo foram: 1) pré-lavagem; 2) pré-lavagem + NaOH 1 % + enxágüe; 3) pré-lavagem + NaOH 1 % + enxágüe + HNO_3 1 % + enxágüe; 4) pré-lavagem + NaOH 1 % + enxágüe + HNO_3 1 % + enxágüe + NaClO a 100 $mg.L^{-1}$ de cloro residual total, pH 10, preparados a partir de hipoclorito de sódio comercial 10 % de CRT. Para avaliação da eficiência dos procedimentos, os cupons foram submetidos às técnicas do *swab* e da rinsagem. Constataram-se diferenças no log_{10} da contagem de esporos entre os tratamentos-controle, pré-lavagem e lavagem alcalina tanto pela técnica de rinsagem quanto pela de *swab* dos cupons. O valor recomendado pela *American Public Health Association (*APHA) de 2 $UFC.cm^{-2}$ de área de equipamento, para que uma superfície seja considerada higienizada, foi obtido após a lavagem ácida, quando avaliada por rinsagem. Este mesmo valor foi alcançado depois da lavagem alcalina, quando avaliada pelo *swab*.

O teste em uso simulado, quando adequadamente elaborado, apresenta resultados que refletem as condições reais, incluindo procedimento de higienização, sujidades, carga microbiana, tempo de contato, dureza da água, tipo de superfície, tipo de aplicação, temperatura, pH e contaminação por manipuladores. O sanitizante é aplicado em uma parte do equipamento ou da superfície, e os microrganismos são recuperados e contados por um dos métodos de avaliação: *swab*, placa de contato e rinsagem, entre outros.

2. Considerações Sobre o Sistema "Cleaning In Place" (CIP)

Nas indústrias de alimentos, o processo de higienização compreende as etapas de limpeza e sanitização, que são complementares (ANDRADE; MACÊDO, 1996; ROCHA et al., 1999). Limpeza é um procedimento que inclui pré-lavagem com água, para remoção das sujidades, seguida do uso de agentes químicos, como detergentes alcalinos e, ou, ácidos para remoção de resíduos orgânicos e minerais das superfícies; e do enxágüe antes da etapa da sanitização, que é realizada com o uso de calor ou de agentes químicos (GIESE, 1991; ANDRADE; MACÊDO, 1996).

Dentre os métodos de higienização, encontra-se o sistema CIP bastante utilizado em indústria de alimentos (TIMPERLEY, 1981; SHARP, 1985; GIESE, 1991). Trata-se de um sistema automático e permanente que não requer a desmontagem de equipamentos e tubulações para a higienização (ANDRADE; MACÊDO, 1996). É constituído basicamente por uma bomba central, tanques para soluções químicas e um conjunto de tubos para distribuição das soluções para os diversos locais da fábrica, podendo ainda estar acoplado a um tanque para água de rinsagem e a um computador, que controla todo o processo de higienização (TROLLER, 1993).

Esse processo possibilita o controle eficiente do fluxo, da temperatura e do tempo de contato das soluções circuladas, permitindo menor tempo de higienização e redução do gasto de água, o que torna o processo mais econômico. Em limpeza de tubulações, a taxa de escoamento do fluido, que confere uma ação mecânica associada a outros fatores que são otimizados pela limpeza CIP, como ação química e térmica e tempo de contato (ANDRADE; MACÊDO, 1996), é importante para se obter um processo de higienização eficiente. Para uma higienização adequada, a Federação Internacional de Laticínios (FIL) determinou uma velocidade mínima de 1,5 $m.s^{-1}$ para os agentes de limpeza e sanitizantes (FLOH, 1993).

Em qualquer sistema de escoamento de fluido, forma-se uma película de separação, ou camada-limite, entre o fluido e a superfície, ou seja, o fluido é difundido pela superfície numa camada fina (FOUST et al., 1982). Há dois tipos de escoamento: o laminar e o turbulento (FELLOWS, 1994). O escoamento laminar caracteriza-se pelo movimento das partículas do fluido em camadas ou lâminas, segundo trajetórias retas e paralelas. No escoamento turbulento, as partículas se movimentam de forma desordenada. O escoamento do fluido é caracterizado por um grupo adimensional, denominado número de Reynolds, que, quando superior a 4.000, indica fluxo turbulento.

O número de Reynolds é calculado segundo a Equação 1 (FELLOWS, 1994; FOUST et al., 1982):

$$Re = \frac{\rho \, v \, D}{\mu} \qquad \textbf{(Equação 1)}$$

em que:

Re = número de Reynolds

ρ = massa es pecífica do fluido ($kg.m^{-3}$)

v = velocidade do escoamento ($m.s^{-1}$)

D = diâmetro da tubulação (m)

μ = viscosidade do fluido ($kg.\ m.s^{-1}$).

A turbulência inicia-se num núcleo central e cresce nas dimensões radiais à proporção que a velocidade média é aumentada. Em razão disso, há maior tensão na parede do tubo e redução da camada-limite, o que resulta em elevação na taxa de transferência do fluido até a superfície (FOUST et al., 1982).

Partículas aderidas à tubulação podem ser removidas pela força de atrito exercida pelo contato entre a camada do fluido e a superfície. A magnitude dessa força depende do tipo de escoamento (McCABE et al., 1993), uma vez que um fluxo turbulento exercerá maior força de atrito que um escoamento laminar.

A velocidade do fluido em tubo cilíndrico está relacionada com a vazão, conforme a Equação 2.

$$V = \frac{v \times \pi \, d^2}{4} \qquad \textbf{(Equação 2)}$$

em que:

V = vazão do escoamento ($m^3.s^{-1}$);

d = diâmetro da tubulação (m); e

v = velocidade ($m.s^{-1}$).

O ponto mais importante quanto à higienização é a vazão de escoamento, isto é, o fluxo. Conforme mencionado, a Federação Internacional de Laticínios determinou que fosse mantida uma velocidade mínima de 1,5 $m.s^{-1}$ das soluções de limpeza e sanitização (FLOH, 1993), para se conseguir adequada higienização.

Em um procedimento típico de higienização CIP para a indústria de laticínios, exigem-se: i) pré-enxágue com água à temperatura de 38 °C a 46 °C, durante 40 seg para remoção de resíduos pouco aderidos à superfície; ii) limpeza com solução alcalina na concentração de 0,5 % a 1 % de alcalinidade cáustica (OH^-) por 15 min, à temperatura de 80 °C, para deslocamento de resíduos orgânicos, lipídios e proteínas; iii) enxágüe a frio por 20 seg, até a remoção do alcalino; iv) lavagem com solução ácida, na concentração de 0,5 % de acidez (H^+), à temperatura de 70 °C, pH 1,5 a 2,0, por 10 min, para remoção de resíduos de natureza inorgânica, como sais minerais; v) enxágüe com água morna até a remoção do ácido; vi) aplicação dos agentes sanitizantes, utilizados conforme Tabela 1; e vii) avaliação do procedimento de higienização por análises microbiológicas ou técnica do ATP-bioluminescência.

Entre os agentes alcalinos mais empregados nas formulações de soluções de limpeza estão os alcalinos fortes, como hidróxido de sódio, em combinação com um agente complexante, por exemplo o EDTA. Como agente ácido, usa-se, geralmente, o ácido nítrico. Dentre os agentes sanitizantes, são utilizados ácido peracético, compostos clorados e também calor, como água quente e vapor (TROLLER,1993; PASSOS, 1992).

Tabela 1 - Alguns sanitizantes que podem ser usados no procedimento de higienização *Cleaning In Place* (CIP)

Sanitizante	Concentração ($mg.L^{-1}$)	pH	Tempo de contato (min)	Temperatura (°C)
Água quente	-	6,5-8,0	5	80
Vapor	-	6,5-8,0	1	>100
Compostos clorados	100-200	6,5-7,5	20-30	20-25
Ácido peracético	60-120	2,0-3,0	20-30	20-25

3. Sistema-Modelo de Circulação de Leite para Estudos de Adesão Bacteriana

Com o objetivo de entender melhor os fatores envolvidos na adesão bacteriana nos equipamentos para processamento de alimentos, desenvolveu-se um sistema-modelo de linha de circulação de leite em aço inoxidável AISI 304, acabamento n° 4, acoplado com cupons de prova (MELO,1997; FIGUEIREDO, 2000; AKUTSU, 2001).

O modelo é composto por uma tubulação de 1,9 cm de diâmetro interno e comprimento total de 5,8 m, por onde circulam o leite e o sanitizante; e por um tanque de 25 L, utilizado como reservatório do produto e das soluções sanitizantes. O reservatório é acoplado a uma bomba centrífuga de ½ HP, para impulsionar as soluções de higienização pelo sistema (Figura 1). Em pontos específicos da tubulação, foram instalados cupons de prova com formatos de curva 90 °, em tê e cilíndricos. As áreas superficiais internas dos cupons de prova são de 108 cm^2 para cupons em formato tê, de 85 cm^2 para os cilíndricos e de 53 cm^2 para aqueles em formato de curva de 90 °. Nesse sistema-modelo foram realizados vários experimentos, alguns deles mostrados na Tabela 2.

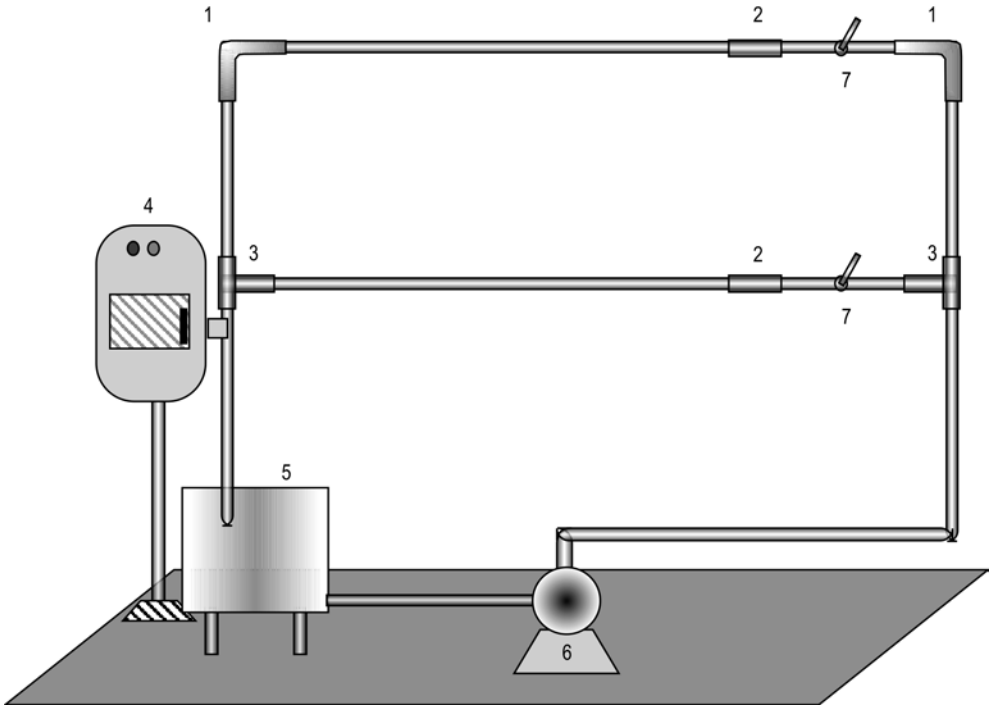


Figura 1 - Modelo de linha de circulação de leite: 1) cupom de prova curva de 90 º, 2) cupom de prova cilíndrico, 3) cupom de prova tê, 4) controle de potência, 5) tanque com capacidade para 25 L; 6) bomba centrífuga e 7) controle de vazão.

Tabela 2. Estudos sobre adesão microbiana usando-se o modelo de circulação de leite

Microrganismos avaliados	Objetivo principal	
Enterococcus faecium *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus cereus*	Avaliar fatores na adesão bacteriana: espécie, tempo, temperatura, fluxo, número inicial	FIGUEIREDO (2000)
Esporos de *Bacillus sporothermodurans*	Resistência a agentes sanitizantes químicos	AKUTSU (2001)
Enterococcus faecium	Resistência a agentes químicos	MELO (1997)

3.1. Adesão de *Enterococcus faecium* a Aço Inoxidável e sua Resistência a Agentes Químicos

A pesquisa realizada por Mello (1997), utilizando-se o sistema-modelo, teve como objetivo avaliar a eficiência de sanitizantes químicos sobre *Enterococcus faecium* (Tabela 3). Esse microrganismo foi isolado de leite cru e apresenta característica de psicrotrófico acidificante, além de resistência à pasteurização lenta do leite.

Tabela 3 - Síntese de pesquisa que avaliou a eficiência de sanitizantes químicos sobre *Enterococcus faecium*

Microrganismo	*Enterococcus faecium*, Gram positivo
Superfície	Aço Inoxidável
Sanitizantes a 25 °C	1. Solução contendo 100 mg.L^{-1} CRT, pH 8,6, preparada a partir de hipoclorito de sódio 2. Solução contendo 1% de quaternário de amônio em pH 10,5 3. Solução de 300 mg.L^{-1} de ácido peracético, em pH 2,6 4. Solução de 100 mg.L^{-1} de digluconato de clorexidina, pH 7,2 5. Solução de 150 mg.L^{-1} CRT preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio, pH 8,7 6. Solução de 12,5 mg.L^{-1} IRL, preparada a partir de iodóforo em pH 1,9
Controle	Água a 25 °C
Teste	Uso simulado
Delineamento experimental	Parcelas subdivididas com quatro repetições Tratamentos principais: seis sanitizantes e água Tratamentos secundários: cupons de prova, em curva de 90°, cilíndrico e em tê

Fonte : Mello, 1997.

O psicrotrófico acidificante estudado foi caracterizado como Gram-positivo, cocos em cadeia, diplococos ou isolados, com crescimento e formação de halo amarelo quando inoculado em ágar púrpura de bromocresol e incubado a 7 °C durante 10 dias ou a 28 °C por 48 h.

A etapa de adesão consistiu em adicionar o *E. faecium*, desenvolvido em suspensão no meio Lactobacilos MRS, no interior dos cupons de prova previamente higienizados, secos em estufa a 110 °C, fechados por rolhas de borracha nas extremidades e esterilizados a 121 °C por 15 min. Ao retirarem as rolhas de uma das extremidades, um volume de 46 mL da suspensão bacteriana foi adicionado ao cupom cilíndrico, 30 mL em cupons de formato de curva e 61 mL ao cupom em formato de tê. Após repouso por 12 horas, a 28 °C, no interior dos cupons, a solução bacteriana foi descartada e o cupom, submetido à secagem a 28 °C, por 30 min. Com os cupons de prova colocados nos locais preestabelecidos no sistema-modelo, as soluções sanitizantes foram circuladas por 10 min, à vazão estimada de 137 $L.min^{-1}$ ($d = 0,0254$ m; $v = 1,5$ $m.s^{-1}$) nos cupons de prova. Após esse processo, os cupons de prova foram removidos e o procedimento de sanitização, avaliado.

Os microrganismos aderidos foram recuperados pela técnica da rinsagem. Para os cupons não-submetidos à sanitização, utilizou-se a solução-tampão fosfato de Butterfield e para aqueles sanitizados, uma solução neutralizante, constituída de 1 g de tioglicolato de sódio, 15 g de lecitina, 20 g de Tween 80, 6 g de tiossulfato de sódio e 2,5 g de bissulfito de sódio por litro, esterilizada a 121 °C por 15 min. Em seguida, procedeu-se à inoculação de alíquotas de diluições decimais apropriadas, em duplicata, pela técnica de profundidade em ágar-padrão (PCA), sendo as placas incubadas a 28 °C por 48 h. As colônias foram contadas e multiplicadas pelo volume da solução de rinsagem para a estimativa da população microbiana. Os resultados foram divididos pela área superficial interna dos cupons de prova e expressos em números de *E. faecium* por cm^2.

O procedimento de sanitização foi avaliado determinando-se o número de reduções decimais na população do *E. faecium*, obtido pela diferença entre o $\log_{10}$ dos microrganismos aderidos aos cupons de prova antes e depois da sanitização. Os sanitizantes que atingiram cinco ou mais reduções decimais na população de células aderidas foram considerados eficientes. Para as comparações de interesse entre os sanitizantes, foi realizado contraste das médias do número de reduções decimais para cada tipo de cupom de prova, em nível de 5 % de probabilidade ($P<0,05$).

As comparações de interesse entre os sanitizantes (Tabela 4) foram estabelecidas com o objetivo de responder a algumas questões de ordem prática que surgem na rotina diária de uma indústria de laticínios.

Tabela 4 - Comparações de interesse entre os sanitizantes avaliados

Comparações de interesse	Objetivos
Água x Sanitizantes	Mostrar que apenas a pré-lavagem não é suficiente para reduzir número de microrganismos nas superfícies em níveis satisfatórios
Dicloroisocianurato de sódio x Hipoclorito de sódio	Comparar a eficiência bactericida de compostos clorados orgânico e inorgânico
Dicloroisocianurato de sódio Hipoclorito de sódio Ácido peracético Iodóforo x Amônia quaternária Clorohexidina	Comparar a eficiência do grupo de sanitizantes que atua por oxidação e daquele que não age sobre as células por esse mecanismo
Dicloroisocianurato de sódio x Iodóforo	Comparar a eficiência de compostos clorados com os compostos iodados
Amônia quaternária x Ácido peracético	Comparar a eficiência de um composto que age como tensoativo com outro que atua por oxidação
Ácido peracético x Hipoclorito de sódio	Comparar a eficiência de sanitizantes, relacionando-a ao custo de produto

Constatou-se que a eficiência dos sanitizantes variou de acordo com o cupom de prova utilizado (Tabela 5). As diferenças de resultados entre os cupons de prova podem estar relacionadas a efeitos hidrodinâmicos e difusionais que ocorreram durante o processo de sanitização. A ação mecânica é atribuída ao efeito do cisalhamento do fluido sobre a parede do tubo, em virtude do escoamento da solução. O escoamento foi classificado como turbulento, com número de Reynolds estimado em 42.000. A turbulência nos cilindros é menor com relação a tubos, como aqueles em curva e em tê. Assim, o cisalhamento pelo fluido sobre a parede dos cupons de prova cilíndricos foi menor, podendo ter causado remoção pouco relevante do microrganismo-teste pelo efeito mecânico.

A ação química dos sanitizantes, de modo geral, é influenciada pela turbulência. A difusão do sanitizante até a superfície da tubulação ocorre numa fina camada-limite, cuja espessura é reduzida com o aumento na turbulência do escoamento (McCAB et al., 1993). Isso resulta em incremento da taxa de transferência do sanitizante até a superfície do tubo, o que levou à maior remoção dos microrganismos nos cupons de prova em curva e em tê.

Ao comparar a eficiência da água e a dos diferentes sanitizantes, observou-se diferença significativa (P<0,05) em todos os cupons de prova. A ação da água sobre o microrganismo ocorreu em virtude da força de atrito do escoamento do fluido sobre a superfície dos cupons de prova, removendo microrganismos, mas atingindo as menores reduções decimais que foram de 0,52 nos cupons cilíndricos, de 3,03 na curva e de 3,08 no tê.

Notou-se maior eficiência de dicloroisocianurato de sódio, devido à quantidade de ácido hipocloroso (HClO) liberado durante o processo de sanitização. Essa solução liberou 8,9 mg.L^{-1} de HClO, enquanto o hipoclorito de sódio, 7,3 mg.L^{-1}.

Ao comparar o grupo de sanitizantes cujo mecanismo de ação é por oxidação com aqueles que apresentam outro tipo de mecanismo, observou-se que não houve diferença significativa (P≥0,05) em nenhum dos tipos de cupons de prova, o que demonstra um mesmo nível de eficiência entre os grupos de sanitizantes avaliados.

Tabela 5 - Resumo do teste F para as comparações de interesse entre sanitizantes, nos cupons de prova cilíndrico, curva e tê

Comparação	Quadrado médio			
	L	Cilindro	Curva	Tê
Água x Sanitizantes		3,0362*	13,42144*	13,0714*
Dicloroisocianurato de sódio x Hipoclorito de sódio		0,0016 N.S	0,0463 N.S	0,8430*
Dicloroisocianurato de sódio Hipoclorito de sódio Ácido peracético Iodóforo x Amônia quaternária Clorohexidina	1	0,0028 N.S	0,0658 N.S	0,0846 N.S
Dicloroisocianurato de sódio x Iodóforo		0,0021 N.S	1,0058*	0,4877 N.S
Amônia quaternária x Ácido peracético		0,0147 N.S	0,0097 N.S	0,0524 N.S
Ácido peracético x Hipoclorito de sódio		0,1661 N.S	0,1973 N.S	0,9875*
	3	0,2071	0,2071 N.S	0,2071

N.S Não-significativo a 5% de probabilidade (P≥0,05).
* Significativo a 5% de probabilidade (P<0,05).

Dicloroisocianurato de sódio e iodóforo submetidos ao teste de uso simulado apresentaram diferença significativa (P<0,05) apenas nos cupons de prova em curva. Nos cupons de prova cilíndrico e em tê, esses sanitizantes exibiram o mesmo nível de eficiência bactericida.

Verificou-se, por meio de contraste entre as médias de reduções decimais, que os sanitizantes amônia quaternária e ácido peracético não apresentaram diferença significativa (P≥0,05) entre eles, nos cupons de prova cilíndricos, em curva e em tê. Esses compostos, nas condições simuladas no experimento, têm a mesma eficiência bactericida.

A fim de relacionar eficiência *versus* custo, compararam-se as médias de reduções decimais (RD) entre um produto de baixo custo, o hipoclorito, e outro de alto custo, o ácido peracético. Verificou-se diferença significativa (P<0,05) entre os sanitizantes somente nos cupons de prova em tê. Numa avaliação com base nas reduções decimais nesse cupom, o ácido peracético atingiu 7,95 RD e o hipoclorito de sódio, 3,61RD. Nos cupons de prova cilíndricos e em curva, não se constatou diferença significativa (P≥0,05) entre os produtos.

Nota-se, com base na Figura 2, que nenhuma das seis soluções sanitizantes circuladas no sistema-modelo apresentou eficiência sobre o *E. faecium* em cupons de prova cilíndricos, considerando-se valores iguais ou acima de 5 RD. Esse valor foi aplicado neste experimento para definir se a solução sanitizante é eficiente, pois, nesse caso, as soluções sanitizantes agiram sobre células sésseis e planctônicas presentes nas superfícies de aço inoxidável.

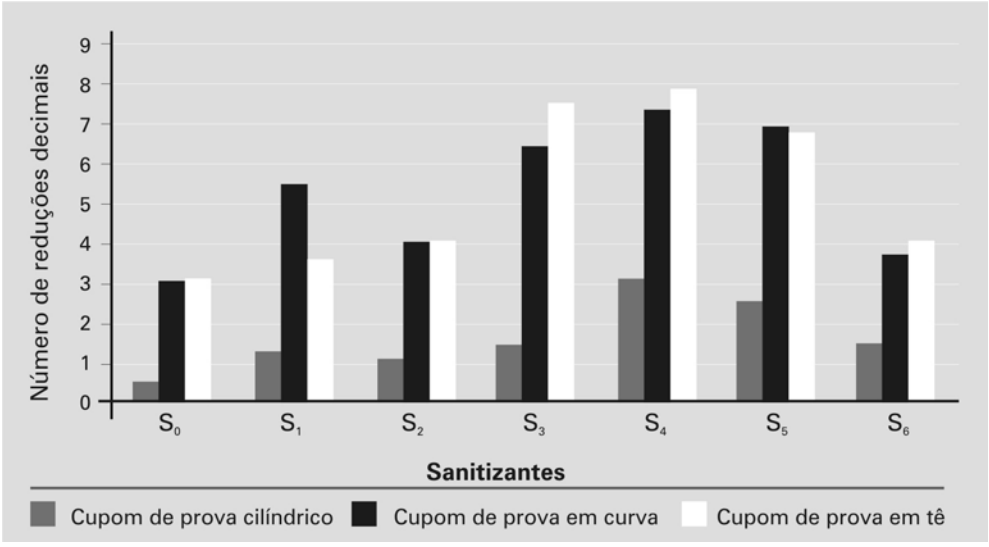


Figura 2 - Médias dos números de reduções decimais (RD) obtidos na população de *Enterococcus faecium*, no teste de uso simulado nos diversos sanitizantes.

So = água; S1 = 100 mg.L^{-1} de cloro residual total, a partir de hipoclorito de sódio, pH 8,6; S2 = 1 % de quaternário de amônio em pH 10,5; S3 = 300 mg.L^{-1} de ácido peracético, pH 2,6; S4 = 100 mg.L^{-1} de gluconato de clorohexidina, pH 7,2; S5 = 150 mg.L^{-1} de CRT preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio, pH 8,7; e S6 = 12,5 mg.L^{-1} de IRL preparada a partir de iodóforo em pH 1,9.

De acordo com os valores das RD, as soluções clorohexidina e iodóforo foram ineficientes contra as células de *E. faecium* nos cupons de prova em curva. Já as de clorohexidina, hipoclorito de sódio e iodóforo não apresentaram eficiência nos cupons de prova em tê.

Considerando que os sistemas CIP não são constituídos apenas por tubulações de formato cilíndrico, de curva ou de tê, estimou-se o tempo necessário para garantir a sanitização eficiente, ou seja, o tempo de contato necessário para reduzir em cinco ciclos $\log_{10}$ a população de *E.faecium* (Figura 3). Os resultados deste experimento mostraram que os cupons de prova que apresentaram os maiores tempos de contato para atingir essas reduções foram os cilíndricos. Assim, esses cupons devem ser considerados como um dos pontos críticos no processo de sanitização de tubulações em sistema CIP, apresentando os seguintes tempos de contato: 96,5 min para a água, 51 min para a clorhexidina, 39,4 min para o hipoclorito de sódio, 39,4 min para o dicloroisocianurato de sódio, 34,2 min para o iodóforo, 19,8 min para a amônia quaternária e 16,4 min para o ácido peracético.

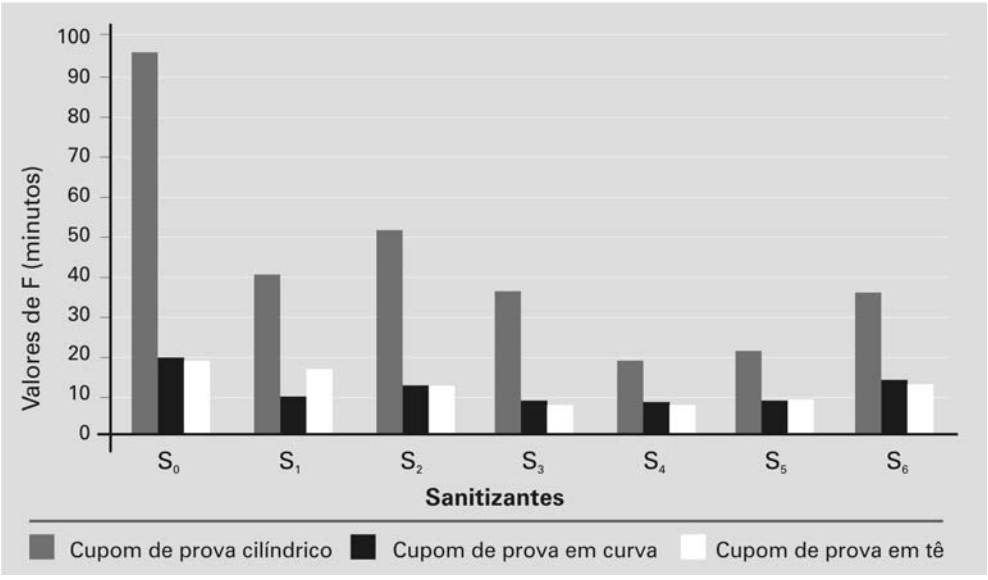


Figura 3 - Tempo necessário para obter 5 RD população de *E. faecium* no teste em uso simulado, dos diversos sanitizantes.

So = água; S1 = 100 mg.L^{-1} de cloro residual total, a partir de hipoclorito de sódio pH 8,6; S2 = 1 % de quaternário de amônio em pH 10,5; S3 =300 mg.L^{-1} de ácido peracético, pH 2,6; S4 = 100 mg.L^{-1} de gluconato de clorohexidina, pH 7,2; S5 = 150 mg.L^{-1} de CRT preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio, pH 8,7; e S6 = 12,5 mg.L^{-1} de IRL preparada a partir de iodóforo em pH 1,9.

As tubulações cilíndricas são um dos pontos críticos de controle para a sanitização em sistema CIP, nas indústrias de laticínios. Em sistemas de vazão de 137 L.min^{-1}, preconiza-se a utilização dos sanitizantes nos tempos mínimos de 16,4 min no ácido peracético e 19,8 min na amônia quaternária, para obter 5 RD e eficiente sanitização em menor tempo.

3.2 - Adesão de Células Vegetativas e Esporos Bacterianos a Superfície de Aço Inoxidável

Usando o modelo de circulação de leite mostrado na Figura 1, Figueiredo (2000) estudou a adesão de bactérias deterioradoras e quantificou a contaminação resultante, a fim de conhecer os microrganismos que apresentavam maior capacidade de adesão e avaliar melhor os fatores (Tabelas 6 e 7) que levaram a uma grande contaminação do leite processado.

Tabela 6 - Fatores avaliados na adesão bacteriana no modelo de circulação de leite

Fatores avaliados	Espécie bacteriana
	Temperatura de contato
	Velocidade de circulação do leite
	Tempo de contato
	Número de microrganismos

Tabela 7 - Síntese da pesquisa que avaliou a adesão de células vegetativas e esporos bacterianos em superfície de aço inoxidável (Fonte: Figueiredo, 2000)

Microrganismos	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442; *Bacillus cereus* NCTC11145 do tipo diarréico (esporos+vegetatitiva) e (esporos) e *Enterococcus faecium*, isolado de leite cru
Superfície	Aço inoxidável
Sanitizantes a 25 °C	Hipoclorito de sódio (100 mg.L^{-1} de CRT, pH 8,6) Quaternário de amônio (10000 mg.L^{-1}, pH 10,5) Ácido peracético (300 mg.L^{-1} pH 2,6) Gluconato de clorohexidina (100 mg.L^{-1} pH 7,2) Dicloroisocianurato de sódio (150 mg.L^{-1} CRT, pH 8,7) Iodóforo (12,5 mg.L^{-1} IRL, pH 1,9)
Controle	Água a 25 °C
Teste	Uso simulado
Delineamento experimental	Parcelas subdivididas com três repetições Tratamentos principais: quatro microrganismos Tratamentos secundários: cupons de prova, em curva 90°, cilíndrico em tê

Na seleção dos microrganismos, consideraram-se os seguintes aspectos: *P. aeruginosa* é uma espécie Gram-negativa contaminante habitual do leite cru, podendo recontaminá-lo após o tratamento térmico; *B.cereus* é causador da coagulação doce em leite UAT e do sabor amargo em creme de leite; e o isolado do leite *E. faecium* é psicrotrófico acidificante.

A análise estatística do experimento baseou-se no número de reduções decimais ocorridas na população de microrganismos antes da circulação do leite (RDA)

e após a circulação do leite (RDB). Considera-se que a adesão será maior para a bactéria que apresentar a menor RD. Nas comparações de interesse, foi aplicado o teste de Tukey a de 5 % de probabilidade ($P<0,05$). Os demais experimentos foram analisados por estatística descritiva.

Para determinação de RDA, foi feito o seguinte cálculo: RDA =log N0 - log N1, em que N0= número total de bactérias (planctônicas e sésseis) dentro do cupom, após 12 h de incubação; e N1 = número de bactérias sésseis dentro do cupom, após 12 h de incubação.

O número de bactérias planctônicas (P1) foi determinado pelo plaqueamento de uma alíquota de 1 mL de leite do interior dos cupons de prova, sendo o resultado multiplicado pela quantidade total do leite contido dentro do cupom de onde se retirou a alíquota.

O número de células sésseis (N1) foi obtido com a rinsagem dos cupons em curva, cilíndricos e em tê, pelo plaqueamento de uma alíquota de 1 mL de solução de citrato de sódio 2 % utilizada na rinsagem dos cupons de prova. Esse número foi multiplicado pela quantidade total da solução de rinsagem utilizada no cupom.

Para obter N2, a rinsagem foi realizada nos cupons em curva, cilíndricos e em tê acoplados ao sistema-modelo e, depois da circulação do leite, na velocidade desejada. Portanto, pela soma de P1 e N1, obteve-se N0.

Para determinação de RDB, fez-se o seguinte cálculo: RDB = log N1 – log N2, em que N2 = número de bactérias que permaneceram aderidas aos cupons, após a circulação do leite.

Como meio de cultivo para *B. cereus* e *E. faecium*, foi utilizado caldo Lactobacilos MRS (Man, Rugosa e Sharpe) e para *P. aeruginosa*, caldo nutriente. Os microrganismos foram cultivados, armazenados sob congelamento e posteriormente ativados nos mesmos meios de cultura antes da utilização. Após a ativação, foram inoculados em 400 mL de leite, de modo a obter uma contagem de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ UFC.mL^{-1}.

Para permitir a adesão, o leite inoculado foi utilizado para encher os cupons de prova em aço inoxidável previamente esterilizados. No cupom em cotovelo, gastaram-se 27 mL de leite; no cupom em tê, 57 mL; e no cupom cilíndrico, 49 mL, respectivamente. Os cupons foram incubados a 18 °C em todos os experimentos, com exceção do experimento que avaliou o efeito da temperatura de refrigeração. O tempo de incubação foi de 12 h, exceto no experimento que avaliou o efeito do tempo de incubação. Após esse período, foram retiradas amostras do leite do interior dos cupons para o plaqueamento, sendo o restante descartado.

Para eliminação de células planctônicas e de esporos aderidos reversivelmente, adicionou-se leite esterilizado no interior dos cupons, que ali permaneceu por 2 min, sendo, após esse tempo, descartado. Um cupom de prova de cada tipo foi rinsado com solução de citrato de sódio 2 %, sendo agitados manualmente por 15 min; em seguida, alíquotas das soluções de rinsagem foram inoculadas em meio de cultura e incubadas em condições apropriadas. Cupons que não tiveram contato com microrganismos foram esterilizados e, subseqüentemente, acoplados no equipamento juntamente com os outros três cupons de prova com os microrganismos aderidos. Ao reservatório do equipamento foram adicionados 10 L de leite esterilizado a 15 °C, circulando por 10 min a 1 $m.s^{-1}$, com exceção do experimento que avaliou a velocidade das soluções na adesão bacteriana.

A seguir são apresentados os principais resultados do experimento de importância relacionada ao procedimento de higienização em indústria de alimentos.

3.2.1 Influência da Espécie Bacteriana no Crescimento e na Adesão ao Aço Inoxidável

A) Crescimento e Adesão a 18 °C de Incubação

De acordo com os dados apresentados na Tabela 8, entre as bactérias avaliadas, *E. faecium* foi a que apresentou a maior capacidade de multiplicação a 18 °C em leite, com aumento de dois ciclos logarítmicos na contagem em placas após 12 h. A contagem de *P. aeruginosa* apresentou incremento de 0,9 ciclo logarítmico, enquanto a de *B. cereus* (esporos e células vegetativas) teve aumento de 0,4 ciclo logarítmico.

Tabela 8 - Contagens microbianas (UFC.mL^{-1}) no leite imediatamente após a inoculação e com 12 h de incubação a 18 °C

Tempo (h)	*Enterococcus faecium*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Bacillus cereus* (esporos + células vegetativas)	*Bacillus cereus* (esporos)
0	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$7,8 \times 10^2$
12	$2,1 \times 10^5$	$7,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^3$

Pesquisa de Andrade e colaboradores (1998) mostrou que *E. faecium* apresenta velocidade específica de crescimento (μ) em caldo MRS a 30 °C de 1,68 h^{-1}. Observa-se pelos resultados que, em caso de abuso de temperatura por período prolongado, os microrganismos que têm alta velocidade específica de crescimento apresentarão maior multiplicação celular, o que pode resultar em grande número de células aderidas aos equipamentos.

Quanto à adesão com 12 h, observou-se que existe diferença com relação ao microrganismo. A maior porcentagem de adesão ocorreu nos esporos de *B. cereus*,

que apresentou menor redução decimal (Tabela 9) de acordo com o teste de Tukey ($P<0,05$). Os microrganismos estudados foram classificados em ordem crescente de redução decimal.

Tabela 9 - Reduções decimais e porcentagem de adesão dos diversos microrganismos na superfície dos cupons de prova com 12 h (RDA) de incubação a 18 °C

Microrganismos	RD
Bacillus cereus (esporos)	0,6[A]
Pseudomonas aeruginosa	1,2[B]
Bacillus cereus (esporos e células vegetativas)	1,7[C]
Enterococcus faecium	2,2[D]

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

É importante, portanto, que o leite seja processado o mais rápido possível, a fim de evitar que ocorra a esporulação durante a estocagem, antes do tratamento térmico, o que poderia comprometer a eficiência desse tratamento. Os esporos podem aderir à superfície de equipamentos e resistir ao processo de higienização, posteriormente germinar e comprometer a qualidade do leite.

Observa-se, pela Figura 4, a classificação dos microrganismos quanto à porcentagem de adesão em aço inoxidável após 12 h a 18 °C. Constatou-se a seguinte ordem decrescente de capacidade de adesão: esporos de *B.cereus* (24,6 %); *P. aeruginosa* (5,83 %); *B. cereus*, nas formas vegetativa e esporulada (2,21 %); e *E. faecium* (0,57 %).

Verificou-se alto porcentual de adesão obtido com os esporos que alcançaram 24,6 %, cerca de 11 vezes maior que a adesão de células vegetativas e esporos (2,21 %). Isso é explicado pelo fato de alguns esporos apresentarem características de hidrofobicidade, o que favorece a sua adesão às superfícies. Essa intensa adesão, aliada à maior resistência ao calor, pode causar problemas nas linhas de circulação do leite, pois os esporos podem resistir ao tratamento térmico e, conseqüentemente, aderir aos equipamentos. Com o tempo, esses esporos podem germinar e dar origem ao biofilme, que servirá como fonte constante de contaminação dos produtos após o processamento térmico.

Há grandes diferenças na capacidade de adesão de diferentes esporos, o que pode ser devido às suas características físico-químicas e morfológicas. Os esporos de *B. cereus* possuem apêndices na sua superfície, e essas estruturas podem ajudar a sobrepor as forças de repulsão eletrostática entre o esporo e a superfície (RONNER et al.,1990). Problemas no sistema de refrigeração de tanques de recepção de leite podem elevar a temperatura, o que resultará em maior crescimento de microrganismos, além de possibilitarem a esporulação. Isso permitirá maior adesão de bactérias às paredes dos tanques, dificultando a higienização.

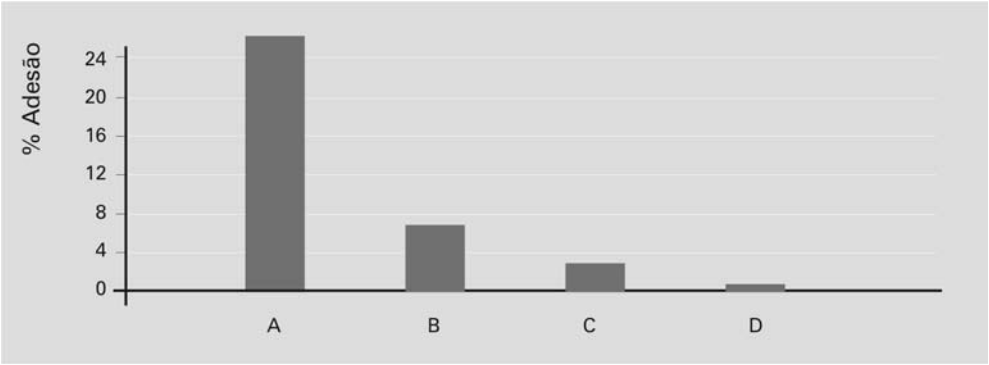


Figura 4 - Porcentagem de adesão média de bactérias, antes da circulação do leite no modelo, calculada em relação ao número total de bactérias dentro dos cupons com 12 h, em aço inoxidável, a 18 °C. A) esporos de *B. cereus*; B) *Pseudomonas aeruginosa*; C) *Bacillus cereus*, incluindo esporos mais células vegetativas; e D) *Enterococcus faecium.*

B) Permanência e Adesão de Microrganismos Após a Circulação do Leite

Observou-se, pela análise de variância (Tabela 10) dos resultados obtidos após a circulação de leite no circuito de processamento, que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) na adesão quando os diferentes microrganismos foram comparados; no entanto, constatou-se diferença quanto à remoção das células nos vários tipos de cupons.

Tabela 10 - Resumo da análise de variância do número de reduções decimais na população de diferentes microrganismos, em vários cupons de prova, após o uso do modelo de circulação de leite, com velocidade de 1m.s^{-1}, por 10 min a 15 °C

FV	GL	SQ	QM	F	$F_{5\%}$
Bactéria	3	0,7837613	0,2612537	2,2119,ns	4,07
Resíduo	8	0,9448708	0,1181088		
Cupom	2	0,4470955	0,2235478	6,30*	3,63
Cupom x inóculo	6	0,4788803	0,07981338	2,25 ns	2,74
Resíduo	16	0,5674057	0,03546286		
Total	35	3,222013			

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.
Não-significativo a 5% de significância pelo teste F.

A interação microrganismos *versus* cupom não foi significativa. Nesse tipo de interação, pode-se verificar se existe a possibilidade de determinada bactéria permanecer aderida, em maior porcentagem, em certo tipo de cupom, ao mesmo tempo que outra espécie avaliada apresenta maior porcentagem de adesão em um segundo tipo de cupom.

O teste de Tukey (Tabela 11) mostrou que há diferença ($P<0,05$) na remoção de bactérias entre os cupons nas formas de tê e cilíndrica. Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na remoção de bactérias em cupons cilíndricos e curvas de 90° e nos cupons nas formas de tê e de cotovelo.

Tabela 11 - Médias de reduções decimais de população de microrganismos nos diferentes cupons de prova, após o uso do modelo de circulação do leite a 1m.s^{-1} por 10 min a 15 °C

Tipo de cupom	RD_a
Tê	1,50^{A}
Curva de 90°	1,47^{AB}
Cilíndrico	1,28^{B}

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5%

Observou-se que 5,36 % das células de *P. aeruginosa* permaneceram aderidas após a circulação do leite no modelo de circuito (Figura 5). Esse porcentual calculado com base no número de células aderidas antes da circulação do leite no circuito representa 1,7 x 10^4 UFC.cm^{-2} de superfície. Esse número de microrganismos ainda é elevado o suficiente para causar problemas de deterioração do leite, uma vez que as proteases e lípases produzidas por espécies de *Pseudomonas* são extremamente resistentes aos tratamentos térmicos do leite.

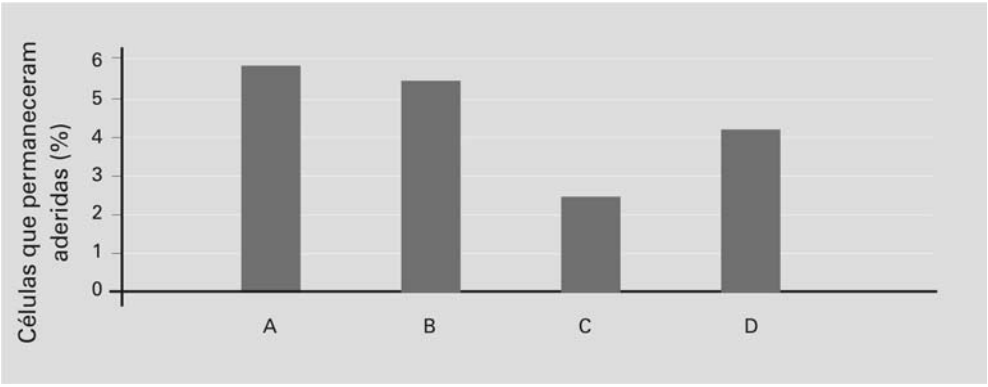


Figura 5 - Porcentagem de células que permaneceram aderidas aos cupons de aço inoxidável, independentemente do tipo de cupom, em tubulação de linha de processamento, após a circulação de leite a 1 m.s^{-1} por 10 min, a 15 °C: A) *Enterococcus faecium*, B) *Pseudomonas aeruginosa,* C) esporos e células vegetativas de *Bacillus cereus* e D) esporos de *Bacillus cereus*.

Observou-se também, pelos resultados, que de cada 200 células de *E. faecium* aproximadamente uma (0,57 %) está aderida, e que, de cada 100 células aderidas, cerca de cinco (5,51 %) não são removidas pelo fluxo de leite a 1 m.s^{-1}. Foram enumerados, antes da circulação do leite, 6,5 x 10^5 UFC.cm^{-2} para *E. faecium*, tendo esse número reduzido para 3,3 x 10^4 UFC.cm^{-2} após a circulação.

Deve-se preocupar, principalmente, com as bactérias que se fixam na superfície do equipamento e resistem ao fluxo e ação das soluções de limpeza. Após um período de processamento de 6 a 8 h, pode-se atingir um considerável número de bactérias aderidas. As células que iniciaram o processo de adesão logo no início do processamento certamente apresentarão maior resistência ao processo de higienização. Ocorrerá, ainda, a liberação de células viáveis para o alimento, a partir de possíveis biofilmes formados.

Adesão de esporos e células vegetativas de *B. cereus* antes da circulação do leite de 2,21 % foi verificada, devendo-se ressaltar que, das células aderidas, 2,3 % não foram removidas pelo fluxo de leite. Deve-se estar atento a alimentos com alta contagem de esporos de *B. cereus*, já que têm elevada capacidade de adesão, com 24,6 %, ainda que somente 4,1 % dos esporos aderidos resistiram ao fluxo de leite.

Podem ser observadas diferentes porcentagens de adesão obtidas nos variados tipos de cupons (Figura 6). Enquanto no cupom tipo tê somente 3,0 % das células não foram removidas pelo fluxo do leite, no cupom cilíndrico 6,0 % das bactérias permaneceram aderidas. No cupom em curva de 90°, a adesão foi de 3,6 %, o que não representa diferença significativa ($P \geq 0,05$) quando comparado com os demais cupons. Constatou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os cupons tipo tê e cilíndricos. Segundo Mello (1997), a turbulência em tubos cilíndricos é menor que a de tubos com formatos contornados, como em curva de 90° e tipo tê. Por essa razão, o cisalhamento pelo fluido sobre as paredes dos cupons de prova cilíndricos é menor, podendo causar menor remoção de microrganismos.

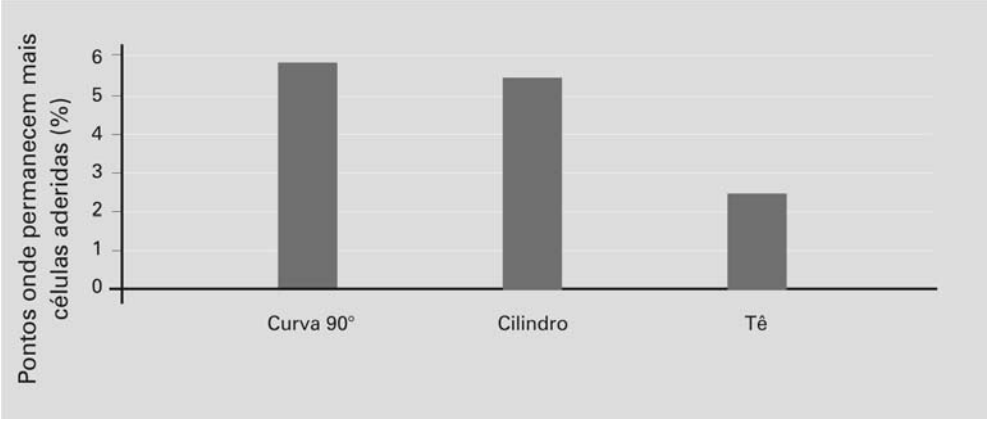


Figura 6 - Porcentagem de células que permanecem aderidas, independentemente do tipo de bactéria, obtida em diferentes tipos de cupons após a circulação do leite a 1 $m.s^{-1}$, durante 10 min, a 15 °C.

3.2.2 - Efeito da Temperatura de Refrigeração

Observa-se, na Tabela 12, que as incubações a 5 °C e 10 °C não resultaram em alteração considerável no número de *P. aeruginosa*, decorrido o período de 12 h de incubação. A 18 °C, o crescimento foi de 0,9 ciclo logarítmico, como constatado anteriormente.

Tabela 12 - Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC.mL^{-1}) no momento da inoculação do leite e com 12 h de incubação, em diversas temperaturas. Médias de três repetições

Tempo (h)	Temperatura		
	5 °C	10 °C	18 °C
0	$1,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
12	$1,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$

Quanto à adesão bacteriana, observou-se (Figura 7) que, à medida que a temperatura aumenta, as porcentagens de *P. aeruginosa* aderidas também aumentam. Dessa maneira, a adesão a 18 °C foi de 5,83 %, o que equivale a $3,2 \times 10^5$ UFC.cm^{-2}. A 10 °C, verificou-se 1,95 % de adesão, representando $2,0 \times 10^4$ UFC.cm^{-2}, e, a 5 °C, constatou-se 1,36 %, equivalente a $9,0 \times 10^3$ UFC.cm^{-2}.

A menor proporção de células aderidas em temperaturas mais baixas ocorreu, provavelmente, em virtude de a velocidade de multiplicação das bactérias ser menor nessas temperaturas. Também, a produção de exopolissacarídeos pode ter sua velocidade afetada negativamente pelo abaixamento da temperatura, além do fato de a mudança de viscosidade do leite poder dificultar a difusão da bactéria até a parede de cupom de prova. A alteração da viscosidade da gordura a 5 °C pode fazer que seja estabelecida uma camada gordurosa na parede dos cupons, dificultando a aproximação de novas bactérias.

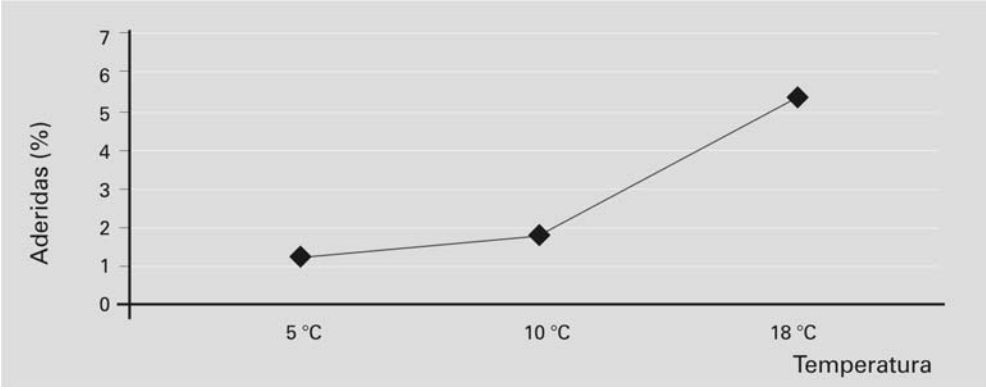


Figura 7 - Porcentagem de adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em cupons de aço inoxidável após 12 h de incubação do leite, nas temperaturas de 5 °C, 10 °C e 18 °C.

Os resultados desta pesquisa diferem dos encontrados por Stone e Zottola (1985), que não detectaram diferença, na proporção de células aderidas, ao estudar a adesão de *Pseudomonas fragi*, suspensa em leite desnatado, em aço inoxidável, nas temperaturas de 4 °C e 25 °C. Esses autores observaram que a produção de exopolissacarídeos em *P. fragi*, a 25 °C, ocorreu em 30 min. Na temperatura de 4 °C, esses polissacarídeos foram observados em 2 h, demonstrando menor velocidade de produção de exopolissacarídeos em temperaturas mais baixas.

Diversos relatos de pesquisas mostram a influência da temperatura sobre a capacidade de adesão dos microrganismos às superfícies para processamento de alimentos. Por exemplo, Hood e Zottola (1995) observaram que *Yersinia enterocolitica* adere melhor em aço inoxidável a 21 °C do que a 35 °C e 10 °C. As células crescidas a 35 °C não apresentavam flagelo, o que influenciou negativamente sua capacidade de aderir. É possível que a temperatura tenha importante papel na formação de estruturas que ajudam o processo de adesão e que temperaturas próximas do ideal para o crescimento celular permitem maior quantidade de células aderidas. Stone e Zottola (1985) encontraram menor proporção de células aderidas a 3 °C, em comparação com a proporção de adesão celular a 20 °C. Segundo Mafu (1990), após 1 hora, células de *L. monocytogenes* são capazes de aderir ao aço inoxidável, com polissacarídeos visíveis ao microscópio eletrônico, tanto a 4 °C quanto a 20 °C.

No experimento de Figueiredo (2000), *P. aeruginosa* a 5 °C não apresentou multiplicação, mas ocorreu o processo de adesão ao aço inoxidável, o que sugere atividade metabólica para produção de exopolímeros.

Pode-se observar, ainda, a porcentagem de bactérias que permaneceram aderidas após a circulação do leite pelo sistema-modelo. A 18 °C, das células aderidas com 12 h de incubação, 5,36 % não foram removidas após a circulação do leite a 1m.s^{-1} (Figura 8). Já a 10 °C e 5 °C os valores foram de 6,95 % e 8,54 %, respectivamente. Verificou-se tendência de aumentar o porcentual de bactérias que permaneceram aderidas após a circulação do leite, à medida que a temperatura diminuía.

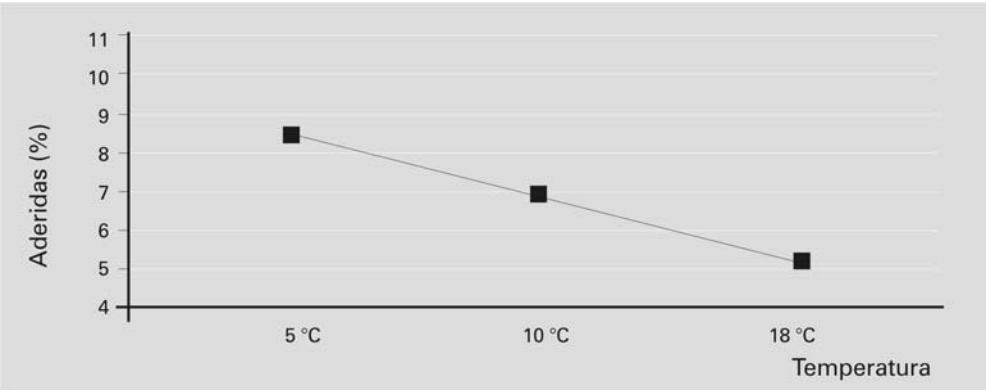


Figura 8 - Porcentagem de *Pseudomonas aeruginosa* que permaneceram aderidas a cupons de aço inoxidável após a circulação do leite a 1 m.s^{-1}, nas temperaturas de 5 °C, 10 °C e 18 °C.

Constata-se que, após a passagem do leite a uma velocidade de 1 m.s^{-1} nos cupons de prova previamente incubados a 18 °C, a adesão do microrganismo correspondeu a 1,7 x 10^4 UFC.cm^{-2}. Essa concentração foi de 1,4 x 10^3 e 7,7 x 10^3 UFC.cm^{-2} quando a incubação para adesão bacteriana ocorreu a 10 °C e 5 °C, respectivamente.

3.2.3 - Efeito da Velocidade de Circulação do Leite

Verificou-se, pelos resultados deste trabalho, que a velocidade de circulação do leite afetou o número de células bacterianas aderidas. À velocidade de 0,5 $m.s^{-1}$, 10,7 % das células permaneceram aderidas aos cupons de prova. Isso significou que a contagem de 3,2 x 10^5 $UFC.cm^{-2}$ foi reduzida para 3,5 x 10^4 $UFC.cm^{-2}$. Na velocidade de 1 $m.s^{-1}$, a porcentagem de bactérias que resistiram ao fluxo foi de 5,36 %, o que fez que o número de bactérias aderidas mudasse de 3,2x10^5 $UFC.cm^{-2}$ para 1,7x10^4 $UFC.cm^{-2}$. À velocidade de 1,5 $m.s^{-1}$, 4,9 % das bactérias permaneceram aderidas, ocorrendo diminuição do número de bactérias aderidas de 2,7x10^5 $UFC.cm^{-2}$ para 1,3 x 10^4 $UFC.cm^{-2}$. Portanto, pode-se observar que, à medida que o fluxo do leite aumenta, mais bactérias são removidas dos cupons.

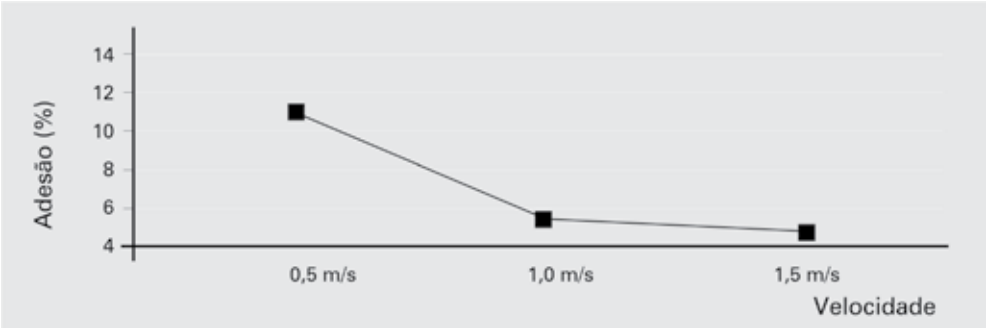


Figura 9 - Porcentagem de células de *Pseudomonas aeruginosa* que permaneceram aderidas a cupons de aço inoxidável, independentemente do tipo de cupom, após a circulação do leite por 10 min a 15 °C, em diferentes velocidades.

Observa-se, pela Figura 9, que se a velocidade de circulação do leite for baixa (0,5 $m.s^{-1}$) haverá maior número de células aderidas nas tubulações, podendo intensificar problemas de formação de biofilmes. Tal fato poderá trazer algumas conseqüências: i) se a baixa velocidade ocorrer antes do processamento térmico do produto, o número de células aderidas às tubulações provavelmente aumentará, ou seja, elas multiplicarão e liberarão quantidade cada vez maior de bactérias para o leite, o que compromete a qualidade do leite pasteurizado, considerando-se que a morte de bactérias pelo calor acontece de forma logarítmica; ii) se a contaminação ocorrer após o processamento térmico do produto, haverá contaminação pós-processamento do leite. Geralmente, no início do período de produção essa contaminação é pequena; porém, no fim do período de processamento, é substancialmente maior.

Outra questão a considerar é a velocidade de bombeamento, ou seja, se demasiadamente alta e a tubulação estiver contaminada, haverá, inicialmente, elevada contaminação do leite, em virtude da transferência de bactérias aderidas para o fluido.

Porém, com o passar do tempo essa contaminação irá diminuir, pois apenas as células fortemente aderidas não serão removidas, e o fluxo irá dificultar a adesão de novas.

As velocidades utilizadas no experimento resultaram em fluxos caracterizados como turbulentos, com número de Reynolds de 4.700, 9.400 e 14.100, nas velocidades de 0,5 $m.s^{-1}$, 1,0 $m.s^{-1}$ e 1,5 $m.s^{-1}$, respectivamente. No entanto, os resultados mostram, no que se refere à adesão bacteriana, não haver diferença relevante entre as velocidades de 1,0 $m.s^{-1}$ e 1,5 $m.s^{-1}$.

A velocidade das soluções de higienização de 1,5 $m.s^{-1}$ é, freqüentemente, utilizada. Quando realizado em baixa velocidade, esse procedimento pode se tornar deficiente. Erros dessa natureza permitem que números elevados de bactérias permaneçam aderidos à superfície

Observou-se certa tendência de permanecer maior número de bactérias sésseis no cupom cilíndrico, independentemente da velocidade de bombeamento do leite (Tabela 13). Porém, deve-se ressaltar que, à medida que o fluxo do leite aumenta, o número de células aderidas diminui. A menor adesão foi no cupom tipo tê, em todas as velocidades de bombeamento utilizadas.

Tabela 13 - Porcentagem de *Pseudomonas aeruginosa* que permaneceram aderidas aos diferentes tipos de cupons de aço inoxidável submetidos às velocidades de 0,5 $m.s^{-1}$, 1,0 $m.s^{-1}$ e 1,5 $m.s^{-1}$, durante 10 min, em modelo de linha de processamento de leite, utilizando como fluido o leite integral a 15 °C

Velocidade ($m.s^{-1}$)	% Adesão		
	Cupom cilíndrico	Cupom em curva de 90°	Cupom tipo T
0,5	18,0	8,9	8,6
1,0	11,9	4,4	2,6
1,5	10,1	4,5	1,4

3.2.4 - Influência da Concentração de Bactérias na Adesão

A) Crescimento e Adesão após 12 h a 18 °C

Verificou-se que o crescimento bacteriano com 12 h de contato, independente da concentração, foi inferior a um ciclo (Tabela 14).

A concentração de células com 12 h de incubação influenciou o número de células de *P. aeruginosa* aderidas aos cupons de aço inoxidável. A Figura10 mostra que em concentrações maiores de células ocorre maior proporção de células aderidas. Após 12 h de incubação, o número inicial foi de $7,3x10^6$ UFC. mL^{-1}. Desses microrganismos, 5,83 % aderiram à superfície. No entanto, a partir dos números iniciais 9,2 x 10^5 UFC.mL^{-1} e $1,7x10^5$ UFC.mL^{-1}, aderiram ao aço inoxidável 2,62 % e 2,26 %, respectivamente.

Esses valores reforçam a necessidade de obter alimentos com baixo nível de contaminação microbiana antes do processamento. Isso implica menor número de bactérias aderidas à superfície e, portanto, menor contaminação do alimento que irá entrar em contato com aquela superfície.

Tabela 14 - Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC.mL^{-1}) no momento da inoculação do leite e com 12 h de incubação a 18 °C. Média de três repetições

Inóculo/ Tempo (h)	Concentração de bactérias (UFC.mL^{-1})		
	1 x 10^6	1 x 10^5	1 x 10^4
0	9,3 x 10^5	2,2 x 10^5	2,9 x 10^4
12	7,3 x 10^6	9,2 x 10^5	1,7 x 10^5

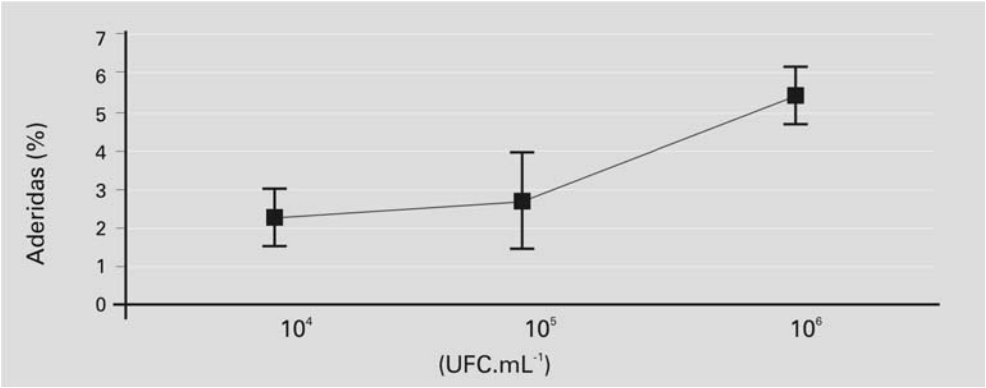


Figura 10 - Influência da concentração inicial de bactérias do leite sobre a porcentagem de células aderidas aos cupons de prova, com12 h de incubação a 18 ºC. Méda de três repetições.

B) Permanência da Adesão Microbiana após a Circulação do Leite

Quanto aos resultados da adesão, obtidos após a circulação do leite no modelo (Figura 11), verificou-se que a proporção de células que permanecem aderidas aos cupons de prova, calculada com base no número de células aderidas antes da circulação do leite no circuito de processamento, foi bastante próxima, independentemente da concentração inicial de células no leite. As porcentagens de adesão celular após a simulação foram de 5,36 %, 4,92 % e 5,83 %, nas concentrações de 7,3 x 10^6 UFC.mL^{-1}, 9,2 x 10^5 UFC.mL^{-1} e 1,7 x 10^5 UFC.mL^{-1}, respectivamente.

É provável que as bactérias aderidas com maior tenacidade à superfície de aço inoxidável do modelo tenham sido aquelas que produzem maior quantidade de exopolissacarídeos. Segundo Kumar e Anand (1998), as substâncias associadas ao biofilme podem limitar a difusão de sanitizantes e provocar alterações fisiológicas nos microrganismos e induzir a produção de enzimas que degradam os sanitizantes. Portanto, ainda que a contaminação da superfície seja relativamente baixa, como 1,2

x 10^2 UFC.cm^{-2}, é difícil prever, após o período de produção de exopolissacarídeos, o grau de eficiência dos sanitizantes no controle dessas bactérias.

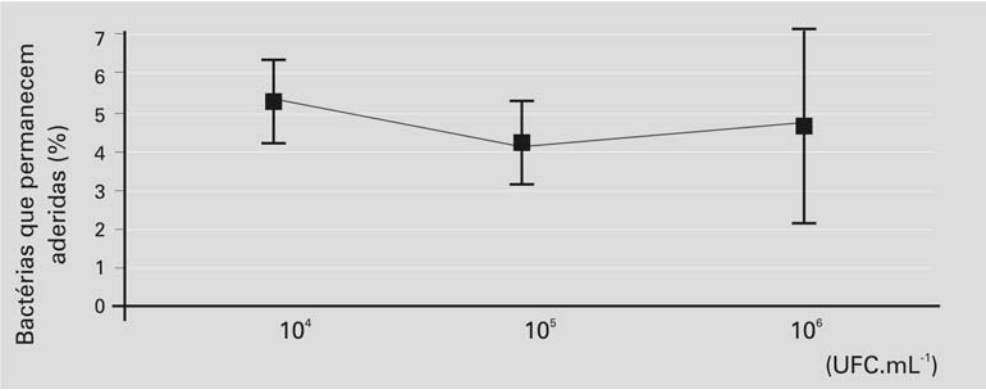


Figura 11 - Porcentagem de bactérias que permaneceram aderidas aos cupons de prova, após a circulação de leite a 1 m.s^{-1}, em temperatura de 15 °C, no simulador de linha de circulação de leite. Média de três repetições.

3.2.5 - Influência do tempo de incubação do leite inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* sobre o processo de adesão

A) Crescimento Microbiano e Adesão após a Incubação a 18 °C

Observou-se no leite incubado por um período de 12 h que houve alteração no número de células de 0,89 ciclo logarítmico (Tabela 15). Em relação ao leite incubado por 24 h, nota-se a alteração de 0,87 ciclo logarítmico.

Tabela 15 - Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC.mL^{-1}) no momento da inoculação do leite e com os períodos de incubação de 12, 24 e 48 h, a 18 °C

Amostragem	Período de incubação		
	12 horas	24 horas	48 horas
Inicial	$9,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
Após incubação	$7,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$

É possível que a mudança da bactéria de um meio que continha caldo nutriente para o leite, juntamente com a alteração de temperatura de incubação de 35 °C para 18 °C, tenha contribuído para o aumento da fase lag, resultando em multiplicação celular semelhante nos tempos de 12 e 24 h. No leite incubado por 48 h, verificou-se alteração de 1,82 ciclo logarítmico. Quanto ao período de 48 h de incubação, *P. aeruginosa* apresentou maior capacidade de se multiplicar devido à adaptação da bactéria às condições do meio.

No que se refere à adesão bacteriana, antes da circulação do leite no modelo, observa-se, pela Figura 12, que há tendência de mais células ficarem aderidas à medida que o tempo de incubação aumenta. Assim, verifica-se uma porcentagem de adesão de 48,7 %, quando a incubação foi por 48 h e com adesão de 5,5 x 10^7 UFC.cm^{-2}, o que caracteriza uma formação de biofilme. Para 24 h, essa porcentagem foi de 7,65, sendo esse valor correspondente a 9,1x 10^5 UFC.cm^{-2}, enquanto para 12 h, foi de 5,83 % de adesão correspondente a 3,2x10^5 UFC.cm^{-2}.

Observou-se, portanto, aumento no número de células aderidas com o incremento do tempo de contato. Tal fato tem implicações na higienização dos equipamentos, uma vez que um alimento mantido armazenado por 48 h, em condições de abuso de temperatura, permitiria a multiplicação de bactérias. Há tempo suficiente para as bactérias aderirem às paredes, consolidarem a adesão e originarem o biofilme.

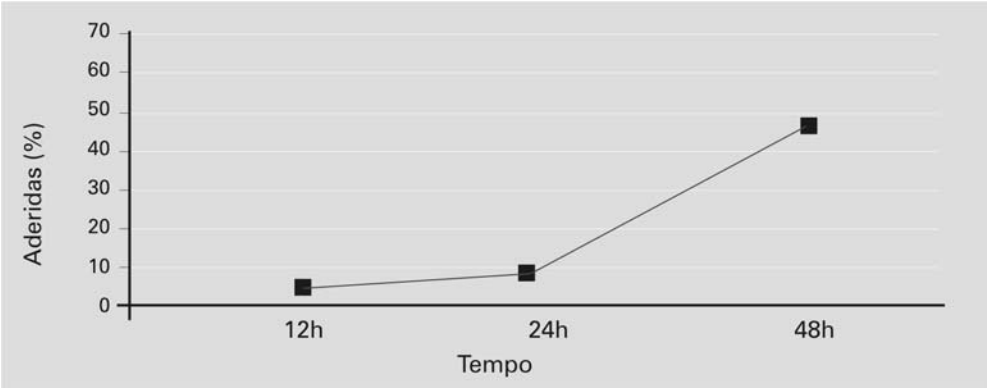


Figura 12 - Influência do tempo de incubação do leite inoculado com 10^6 UFC.mL^{-1} sobre a porcentagem de células aderidas aos cupons de prova a 18 °C.

B) Permanência da Adesão Microbiana após a Circulação do Leite

Conclui-se pelos resultados obtidos na adesão bacteriana, após a circulação do leite pelo modelo (Figura 1), que a maior parte das células anteriormente aderidas não resiste ao fluxo de 1 m.s^{-1}, sendo retiradas das paredes do cupons de prova.

Para 48 h de incubação, a adesão de *P. aeruginosa* de 48,7 % antes da circulação do leite reduziu-se para 2,91 % após a circulação do leite a 1 m.s^{-1}, restando 1,6 x 10^6 UFC.cm^{-2} aderidas aos cupons de prova (Figura 13).

No tempo de 24 h de incubação, houve adesão de 7,65 % antes da circulação do leite no modelo, e 5,6 % das células anteriormente aderidas resistiram ao fluxo do leite, o que correspondeu a 5,1 x 10^4 UFC.cm^{-2}.

Quando a incubação foi de 12 h, a porcentagem de adesão de 5,83 % antes da circulação do leite no modelo manteve-se bem próxima após a circulação do leite a 1 m.s^{-1}, com 5,36 % de adesão, o que correspondeu a 1,7 x 10^4 UFC.cm^{-2}.

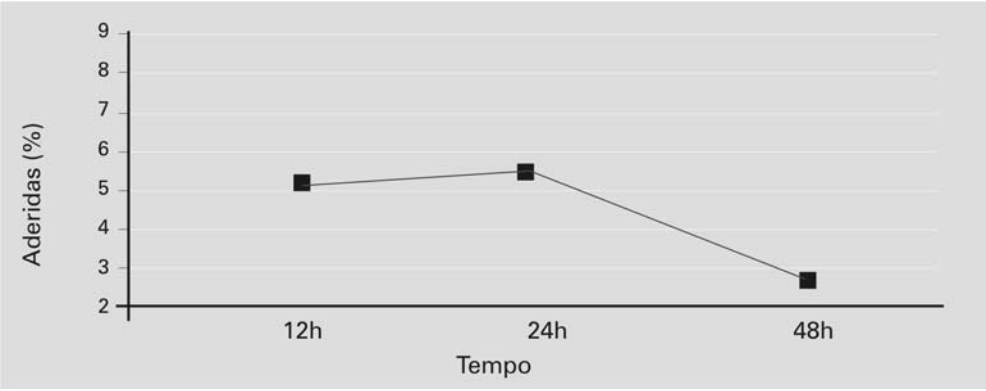


Figura 13 - Porcentagem de bactérias que resistiram ao fluxo de 1 $m.s^{-1}$ de leite em modelo de linha de leite, após a incubação a 18 °C.

3.3 - Adesão de esporos de *Bacillus cereus* em Aço Inoxidável: Efeito do Fluxo e do Tempo de Adesão

Usando o modelo de circulação de leite (Figura 1), Cabral e colaboradores avaliaram a adesão de esporos de *Bacillus cereus* (Tabela 16).

Tabela 16 - Síntese do experimento que avaliou o efeito da velocidade de circulação do alimentos e do tempo de adesão de *Bacillus cereus* em aço inoxidável

Microrganismo	Esporos de *Bacillus cereus*
Superfície	Aço inoxidável, AISI 304 , acabamento nº4
Velocidade ($m.s^{-1}$)	0,5; 1,0; e 1,5
Tempo de adesão (h)	12; 24 ; e 48
Temperatura de adesão (°C)	8
Número de esporos ($UFC.mL^{-1}$)	10^8

Suspensão dos Microrganismos

As suspensões de esporos de *Bacillus cereus* foram obtidas por meio da seguinte técnica: i) Após três repicagens consecutivas em ágar nutriente, solidificado na posição inclinada em tubo de ensaio de 15 mm x 160 mm e incubações de 24 h a 32 °C, das culturas de *Bacillus cereus,* foram obtidas suspensões de células vegetativas pela adição de solução-tampão de fosfato e agitação manual; ii) Em seguida, volumes de 1 mL dessas suspensões foram inoculados nas superfícies de 50 mL de meio de esporulação - ágar nutriente adicionado de sulfato de manganês e amido - contidos em frascos de Roux. A incubação prolongou-se até a obtenção de cerca de 90 % a 95 % de esporulação constatada por observação por microscopia de contraste de fase; iii) ao fim da incubação, foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada sobre a superfície do meio de cultura dos frascos de Roux e pérolas de

vidro esterilizadas. Os frascos foram agitados manualmente e os sobrenadantes, coletados em tubos de centrífuga; e iv) a centrifugação foi efetuada a 2.500 g durante 15 min, a 4 °C. Os sedimentos de esporos foram ressuspensos em água destilada esterilizada e novamente centrifugados, e o processo foi repetido por cinco vezes. Ao final, os esporos foram suspensos em água destilada esterilizada e mantidos a 4 °C. As suspensões de esporos foram padronizadas para conter em torno de 10^9 esporos por mL e serem usadas no processo de adesão dos esporos no simulador da linha de processamento de leite. A adesão dos esporos aos cupons ocorreu a 8 °C e 18 °C.

Processo de Adesão dos Esporos

Depois da ressuspensão dos esporos em 500 mL de água esterilizada, a suspensão foi adicionada no interior dos cupons de prova previamente esterilizados. Para isso, as rolhas das extremidades de cada cupom de prova foram retiradas, a suspensão de esporos adicionada no interior dos cupons e as rolhas recolocadas. A suspensão permaneceu em repouso, no interior dos cupons, por cerca de 12 h, a 8 °C e 18 °C , sendo em seguida descartada. Em seguida, os cupons de prova foram submetidos à secagem a 25 °C, por 30 min e, logo após, novamente enchidos com água esterilizada, a qual permaneceu dentro dos cupons por 1 min, sendo essa água depois descartada. Objetivou-se, nesse último processo, eliminar esporos planctônicos, ou seja, os que não estavam aderidos à superfície. Foi utilizada água esterilizada para garantir que nenhum esporo da suspensão germinasse.

Procedimento para Simulação

Com os cupons de prova colocados nos locais preestabelecidos no sistema-modelo, o tanque do simulador foi enchido com 20 L de água esterilizada, sendo circulados por 10 min. Após, os cupons de prova foram removidos, realizando-se, então, a contagem de esporos que foram retirados da superfície pela água e a contagem dos que permaneceram aderidos aos cupons.

Avaliação da Capacidade de Adesão

Os microrganismos aderidos aos cupons de prova foram recuperados pela técnica de rinsagem, sob agitação, durante 15 min. Para isso, foi utilizada uma solução-tampão fosfato de Butterfield (ICSMF,1978) nos cupons submetidos ao teste. O volume de solução utilizado foi equivalente a 80 % do volume empregado para adesão da suspensão do esporo.

Em seguida, foi feito o plaqueamento utilizando-se a técnica de profundidade em ágar-padrão (PCA). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h. As colônias, após contadas, foram multiplicadas pelo volume da solução de rinsagem, para a estimativa da população microbiana. Os resultados foram divididos pela área superficial interna dos cupons de prova e expressos em $UFC.cm^{-2}$.

Para limpeza da superfície dos cupons de prova, utilizou-se solução de NaOH 1 % de alcalinidade cáustica (OH^-), durante 30 min, com posteriores enxágüe e escovação em água corrente até a reação negativa com fenolftaleína 1 %. Depois de secos em estufa à temperatura de 110 °C, os cupons eram fechados com rolhas nas extremidades e esterilizados a 121 °C, por 15 min.

A limpeza do equipamento foi feita da seguinte maneira: i) pré-enxágüe com água à temperatura ambiente por 5 min; ii) limpeza com hidróxido de sódio 1 % e 80 °C por 20 min; iii) enxágüe até a remoção do hidróxido de sódio, o que foi constatado por meio de reação com fenolftaleína como indicador; iv) lavagem ácida com ácido nítrico 0,5 % de acidez (H^+), 70 °C durante 10 min; v) enxágüe até a remoção do ácido nítrico, constatada pela reação com metilorange como indicador; vi) sanitização com solução de 100 $mg.L^{-1}$ de CRL, em pH 8,0, à temperatura de 20-25 °C, preparada a partir de hipoclorito de sódio; vii) enxágüe até a remoção do cloro, constatada por reação com solução de *N,N-dietil-p-phenylenne diamine* (DPD) como indicador.

Constatam-se, pelas Tabelas 17 e 18, as influências das velocidades e dos tempos diferentes no processo de adesão dos esporos de *B. cereus* na superfície de aço inoxidável. São essas as porcentagens de adesão dos esporos nos cupons, antes do procedimento de circulação no simulador, com 12 h: 7,11; 7,54; e 22,08; com 24 h: 8,44; 33,73; e 21,99, respectivamente. Já após a circulação no sistema simulador foram essas as porcentagens de esporos que continuaram aderidos, na temperatura de 8 °C e tempo de 12 h: 21,37; 30,33; e 16,88, respectivamente, nas velocidades de 0,5 $m.s^{-1}$, 1,0 $m.s^{-1}$ e 1,5 $m.s^{-1}$. No tempo de 24 h, são esses os valores de porcentagem de adesão encontrados: 40,21; 41,90; e 30,27, respectivamente, nas mesmas velocidades. Esses valores de adesão são elevados. Verificou-se, portanto, a tendência de maior adesão à medida que o tempo aumentou de 12 h para 24 h. Em relação ao fluxo, constatou-se que as diferenças na adesão dos esporos ocorreram particularmente entre 0,5 $m.s^{-1}$ e 1,5 $m.s^{-1}$, e a maior adesão aconteceu quando o fluxo foi menor.

Tabela 17 - Porcentagem de adesão ($UFC.cm^{-2}$) de *Bacillus cereus* em cupons de testes antes e depois da circulação de água num simulador de linha de circulação de leite, após tempo de contato de 12 h em velocidades de 0,5 $m.s^{-1}$, 1,0 $m.s^{-1}$ e 1,5 $m.s^{-1}$

	0,5 $m.s^{-1}$	1,0 $m.s^{-1}$	1,5 $m.s^{-1}$
Adesão inicial	7,11	7,54	22,08
Adesão final	21,37	30,33	16,88
Curva	23,83	28,13	23,08
Reta	28,14	29,61	28,25
Te	14,93	23,09	10,55

Tabela 18 - Porcentagem de adesão (UFC.cm^{-2}) de *Bacillus cereus* em cupons de testes antes e depois da circulação de água num simulador de linha de circulação de leite, após o tempo de contato de 24 h em velocidades de 0,5 m.s^{-1} , 1,0 m.s^{-1} e 1,5 m.s^{-1}

	0,5 m.s^{-1}	1,0 m.s^{-1}	1,5 m.s^{-1}
Adesão inicial	8,44	33,73	21,99
Adesão final	40,21	41,90	30,27
Curva	55,01	25,80	36,71
Reta	42,59	50,39	25,10
Te	37,80	40,63	32,76

Observa-se, pelos resultados, que a higienização de equipamentos deve ocorrer logo após o uso na indústria de alimentos. Além disso, é fundamental que a velocidade das soluções detergentes e sanitizantes seja bem estabelecida, de modo a se ter uma higienização eficiente. As velocidades das soluções de higienização devem ser mais elevadas do que as de processamento de alimentos e, geralmente, acima de 1,5 m.s^{-1}.

3.4 - Adesão de Esporos de *Bacillus sporothermodurans* a Aço Inoxidável e sua Resistência a Sanitizantes Químicos

Utilizando modelo de circulação de leite (Figura 1), Akutsu (2001) avaliou a adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* CCT6247 em cupons de aço inoxidável e sua resistência a sanitizantes químicos, em condições de uso simulado (Tabelas 19 e 20).

Seis cupons de prova, sendo dois em formato de curva de 90°, dois cilíndricos e dois em tê, foram inoculados com uma suspensão em tampão-fosfato de 0,31 M em pH 7,0 +/- 0,1, contendo cerca de 10^5 esporos.mL^{-1} de *B. sporothermodurans* por 12 h a 30 °C.

Simulou-se um processo de sanitização CIP, circulando-se 15 L das soluções sanitizantes à temperatura entre 20-25 °C, pelo tempo de 15 min, a uma velocidade de 1,5 m.s^{-1} nos cupons de prova, obtida a partir de uma vazão estimada de 25,7 L por minuto e considerando o diâmetro do tubo de 1,9 cm. A água esterilizada foi usada para avaliar a remoção mecânica dos esporos aderidos.

As soluções sanitizantes avaliadas pelo teste em uso simulado foram preparadas a partir de produtos comerciais concentrados. As concentrações das soluções utilizadas de cada sanitizante são apresentadas na Tabela 21.

Tabela 19 - Síntese do experimento que avaliou a adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* CCT6247 em cupons de aço inoxidável e sua resistência a sanitizantes químicos, em condições de uso simulado (Fonte: AKUTSU, 2001)

Microrganismo	*Bacillus sporothermodurans* CCT6247
Superfície	Aço inoxidável
Sanitizantes a 25 °C	S_1: água (controle) S_2 : hipoclorito de sódio, contendo 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 9,45 S_3 : hipoclorito de sódio, contendo 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 8,0 S_4 : hipoclorito de sódio, contendo 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 7,0 S_5 : cloramina orgânica a 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 7,18 S_6 : cloramina orgânica a 60 mg.L^{-1} de CRT, pH 7,18 S_7 : ácido peracético a 60 mg.L^{-1}, pH 3,4 S_8 : ácido peracético a 30 mg.L^{-1}, pH 3,7
Teste	Uso simulado
Delineamento experimental	Parcelas subdivididas com 24 tratamentos e três repetições, inteiramente casualizadas Tratamentos principais: sete sanitizantes e água Tratamentos secundários: cupons de prova, em curva de 90°, cilíndricos e em tê Utilizou-se SAS para realizar as análises estatísticas As diferenças das reduções decimais do número dos esporos de *B. sporothermodurans* entre os sanitizantes foram analisadas por meio de análise de variância, a 5% de probabilidade Para as comparações de interesse entre os sanitizantes (Quadro 1), foi realizado contraste das médias do número de reduções decimais dos cupons de prova, a 5% de probabilidade

Observou-se que os esporos de *B. sporothermodurans* apresentaram capacidade de adesão aos cupons de prova; porém, não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre eles (Tabela 22). Os $logs_{10}$ do número de esporos aderidos por cm^2 aos cupons no formato de cotovelo 90°, cilíndricos e tê foram, respectivamente, de 4,01; 3,88; e 4,03 (Tabela 23); e as porcentagens de adesão foram de 3,93 no cupom em formato de curva de 90°, 2,55 no cilíndrico e 4,46 no tê (Tabela 23).

Tabela 20 - Comparações de interesse entre sanitizantes por cupom de prova

Comparações de interesse	Objetivos
(C1) S_1 x S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8	Mostrar que apenas a pré-lavagem não é suficiente para reduzir o número de microrganismos nas superfícies em níveis satisfatórios
(C2) S_2 x S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8	Comparar soluções de um composto clorado inorgânico com outras soluções de uso comum na indústria de alimentos
(C3) S_3 x S_4	Mostrar a ação esporicida de soluções em um composto clorado inorgânico em diferentes valores de pH
(C4) S_3, S_4 x S_5, S_6, S_7, S_8	Comparar a eficiência entre as soluções de hipoclorito de sódio a 100 $mg.L^{-1}$ de CRT em pH 8,0 e 7,0, cloramina orgânica a 100 e 60 $mg.L^{-1}$ de CRT e ácido peracético a 60 e 30 $mg.L^{-1}$
(C5) S_5, S_6 x S_7, S_8	Comparar a eficiência esporicida de soluções preparadas de compostos clorados orgânicos e soluções à base de ácido peracético
(C6) S_5 x S_6	Comparar a eficiência esporicida de soluções preparadas a partir de cloraminas orgânicas
(C7) S_7 x S_8	Comparar a eficiência esporicida de soluções à base de ácido peracético

Tabela 21 - Concentração e pH de produtos comerciais e soluções sanitizantes

Sanitizante comercial	Concentração da solução	pH da solução
Hipoclorito de sódio (ABC/Itaperuna) CRT 8,6%, pH 13,45	100 $mg.L^{-1}$ de CRT, expressos em Cl_2	9,45, 8,0 e 7,0, (corrigidos com ácido nítrico comercial)
Dicloro s. triazinatriona sódica diidratada (SUMAVEG/Lever industrial) CRT 3 %	100 e 60 $mg.L^{-1}$ de CRT expressos em Cl_2	7,18
Ácido peracético (Votexx/ECOLAB) 3% ácido peracético, 6,3% peróxido de hidrogênio e pH 1,3	60 e 30 $mg.L^{-1}$	3,4 e 3,7

Tabela 22 - Resumo da análise de variância do log_{10} do número de esporos.cm^{-2} de *Bacillus sporothermodurans* aderidos nos diferentes cupons de prova do modelo de linha de circulação de leite, após 12 h de incubação a 30 ºC

FV	GL	QM
Tratamentos	26	0,213^{ns}
Erro	9	0,098

ns Não-significativo a 5% de probabilidade (P ≥ 0,05).

Tabela 23 - Porcentagem e log_{10} do número de esporos de *Bacillus sporothermodurans* (UFC.cm^{-2}) aderidos a aço inoxidável, AISI 304 nº 4, após 12 h de contato, a 30 ºC

Cupom	% de adesão	Log_{10} UFC.cm^{-2}
Curva de 90°	3,93	4,01
Cilíndrico	2,55	3,88
Tê	4,46	4,03
Média geral	3,65	3,97

Neste estudo, o número de células aderidas de *B. sporothermodurans* não constituiu um biofilme, já que, de acordo com Zottola (1997), para isso seria necessária uma adesão entre 10^6 e 10^7 UFC.cm^{-2}. No entanto, nessas condições a superfície encontra-se em situação inadequada para o uso, pois a APHA (*American Public Health Association*) sugeriu o máximo de 2 UFC.cm^{-2} para superfícies adequadamente higienizadas (Evancho et al., 2001). Portanto, a presença desses esporos aderidos às superfícies em quantidade superior à sugerida pode implicar possível contaminação de alimentos.

Há diferença significativa (P<0,05) na eficiência dos sanitizantes químicos sobre os esporos de *B. sporothermodurans* aderidos; porém, não se constatou influência dos tipos de cupom: tê, curva de 90 ° e cilíndrico (Tabelas 24 e 25).

Tabela 24 - Resumo da análise de variância do número de reduções decimais de *Bacillus sporothermodurans* pela ação dos sanitizantes, nos diferentes cupons de prova do modelo de linha de circulação de leite, após circulação a 1,5 m.s^{-1} por 15 min, à temperatura ambiente (20-25 ºC)

FV	GL	QM
Sanitizante	7	4,599*
Erro(a)	16	0,212
Cupom de prova	2	0,394^{ns}
Cupom de prova x Sanificante	14	0,142^{ns}
Erro(b)	32	0,162

* Significativo a 5% de probabilidade (P< 0,05).
ns Não-significativo a 5% de probabilidade (P ≥ 0,05).

Tabela 25 - Resumo do teste F das comparações de interesse entre sanitizantes

Comparação	GL	QM
(C1) S_1 x S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8	1	7,451*
(C2) S_2 x S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8	1	2,555*
(C3) S_3 x S_4	1	$0,078^{ns}$
(C4) S_3, S_4 x S_5, S_6, S_7, S_8	1	$0,243^{ns}$
(C5) S_5, S_6 x S_7, S_8	1	$0,226^{ns}$
(C6) S_5 x S_6	1	$0,135^{ns}$
(C7) S_7 x S_8	1	$0,042^{ns}$
Erro a	16	0,212

* Significativo a 5% de probabilidade (P< 0,05).
ns Não-significativo a 5% de probabilidade (P ≥ 0,05).

S_1: água; S_2: hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 9,45; S_3: hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 8,0; S_4: hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 7,0; S_5: cloramina orgânica a 100 mg.L^{-1} de CRT, pH 7,18; S_6: cloramina orgânica a 60 mg.L^{-1} de CRT, pH 7,18; S7: ácido peracético a 60 mg.L^{-1}, pH 3,4; S_8 e ácido peracético a 30 mg.L^{-1}, pH 3,7.

Ao comparar a eficiência da água, por ação mecânica, e a dos diferentes sanitizantes, por ação química, notou-se efeito significativo (P<0,05) (Tabela 25). A remoção dos esporos, nesse caso, ocorreu devido à força de atrito da água sobre a superfície dos cupons de prova, ou seja, apenas da ação mecânica gerada pelo escoamento do fluido pela superfície, que se classificou em turbulento, com o número de Reynolds estimado em 32.000 (ρ= 997 kg/m^3; v=1,5 m/s; d= 0,01905 m e μ= 0,0009 kg/m.s).

Neste experimento, verificou-se que a circulação da água, a uma velocidade de 1,5 m.s^{-1} por 15 min, reduziu em média 0,74 RD da população dos esporos de *B. sporothermodurans* aderidos aos cupons (Quadro 7), ou seja, 6,98 x 10^3 UFC.cm^{-2}, o que significa que 74,79 % de esporos foram removidos da superfície.

Tabela 26 - Reduções decimais (RD) na população de esporos de *Bacillus sporothermodurans* devido à ação dos sanitizantes circulados por 15 min a 1,5 m.s^{-1}, à temperatura ambiente (20-25 ºC), no modelo de linha de circulação de leite

Tratamentos	Curva 90 º	Cilíndrico	Tê	Média geral
Água	0,83	0,50	0,88	0,74
Hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 9,45	1,33	1,31	2,06	1,57
Hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 8,0	2,26	2,82	2,77	2,62
Hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 7,0	2,85	2,89	2,78	2,84
Cloramina orgânica a mg.L^{-1} CRT, pH 7,18	2,44	2,93	2,94	2,77
Cloramina orgânica a 60 mg.L^{-1} CRT, pH 7,18	2,42	2,53	2,45	2,47
Ácido peracético a 60 mg.L^{-1}, pH 3,4	2,49	2,40	2,39	2,43
Ácido peracético a 30 mg.L^{-1}, pH 3,7	2,16	2,10	2,52	2,26

Quanto aos sanitizantes químicos, verificou-se efeito significativo ($P < 0,05$) entre o hipoclorito de sódio, contendo 100 $mg.L^{-1}$ de cloro residual total (CRT) sem correção de pH (pH 9,45), e os demais sanitizantes. Ressalta-se, nesse caso, que a ação química dos sanitizantes foi influenciada pelo escoamento do fluido. Quando o escoamento é turbulento, a transferência do sanitizantes até a superfície é maior, resultando em remoção mais eficiente dos microrganismos aderidos.

As diferenças de eficiência obtidas entre as soluções de hipoclorito de sódio a 100 $mg.L^{-1}$ de CRT em pH 9,45; 8,0; e 7,0 e as de cloramina orgânica a 100 e 60 $mg.L^{-1}$ de CRT podem ser explicadas pela concentração de ácido hipocloroso (HClO) nelas presente, que é o agente antimicrobiano.

Reordenando os termos da equação de *Henderson-Hasselbalch*, é possível determinar a concentração de ácido hipocloroso nas soluções cloradas, da seguinte maneira:

$$\textbf{mg.L}^{-1}\ \textbf{de HClO} = \frac{\textbf{mg.L}^{-1}\ \textbf{de cloro residual livre}}{1 + 10^{\,pH - 7,5}}$$

A solução de hipoclorito de sódio contendo 100 $mg.L^{-1}$ de CRT e pH 9,45 (sem correção de pH) apresentou menor concentração de ácido hipocloroso (Tabela 27), o que explica sua menor ação sobre os esporos aderidos nos cupons de prova. Com a correção do pH desta solução clorada para pH 8,0 e 7,0, obteve-se maior liberação de ácido hipocloroso. Assim, ao reduzir o pH houve maior concentração de ácido hipocloroso e menor de íon hipoclorito, aumentando a eficiência do sanitizante (DYCHDALA, 1991; GIESE, 1991).

Tabela 27 - Efeito da concentração de ácido hipocloroso (HClO) das soluções sanitizantes na ação esporicida sobre *Bacillus sporothermodurans*

Sanitizantes	HClO ($mg.L^{-1}$)	Reduções decimais. (RD)
Hipoclorito de sódio a 100 $mg.L^{-1}$ CRT, pH 9,45	1,68	1,57
Hipoclorito de sódio a 100 $mg.L^{-1}$ CRT, pH 8,00	24,08	2,61
Hipoclorito de sódio a 100 $mg.L^{-1}$ CRT, pH 7,00	75,59	2,84
Cloramina orgânica a 100 $mg.L^{-1}$ CRT, pH 7,18	67,63	2,77
Cloramina orgânica a 60 $mg.L^{-1}$ CRT, pH 7,18	40,43	2,47

Quando o pH da solução de hipoclorito de sódio, contendo 100 $mg.L^{-1}$ de CRT, foi corrigido com ácido nítrico de 9,45 para 8,0 e 7,0, as concentrações de ácido hipocloroso aumentaram de 1,68 $mg.L^{-1}$ para 24,08 $mg.L^{-1}$e 75,59 $mg.L^{-1}$, respectivamente, e os tempos para se conseguir 1 RD (nesse caso, assumido como valor D) na população de esporos correspondentes a essa variação foram de 9,55 min para 5,75 min e 5,28 min (Tabela 27).

Observou-se, portanto, melhor eficiência quando o pH dessa solução é diminuído, o que também foi constatado por Andrade e Serrano (1993). Esses pesquisadores, utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a uma concentração de 105 $mg.L^{-1}$ em pH 9,0; 8,0; e 7,0, a 30 °C, em teste de suspensão, sobre esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 19659, observaram redução no valor de D quando a concentração de ácido hipocloroso foi aumentada. Essa solução, em pH 9,0, apresentou concentração de 3,22 $mg.L^{-1}$ de ácido hipocloroso, e a diminuição do pH para valores de 8,0 e 7,0 fez que essa concentração fosse aumentada para 25,24 $mg.L^{-1}$ e 79,55 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Os valores de D obtidos foram de 5,77; 0,94; e 0,25 min, respectivamente.

Os resultados dos experimentos com *B. sporothermodurans* e *B. subtilis*, anteriormente mencionados, levam às seguintes considerações: i) os esporos de *B. sporothermodurans* são mais resistentes que os de *B. subtilis* ao ácido hipocloroso; ou ii) a maior resistência está associada ao fato de os primeiros estarem aderidos à superfície de aço inoxidável, o que parece ser mais provável.

Não foi constatada diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as soluções de hipoclorito de sódio corrigidas para pH 8,0 e 7,0 e as soluções de cloramina orgânica 100 $mg.L^{-1}$, e 60 $mg.L^{-1}$ CRT (Tabela 26), apesar da diferença na concentração do ácido hipocloroso (27).

Por meio da equação que relaciona o $\log_{10}$ dos valores de D em virtude da concentração de ácido hipocloroso (Figura 14), foi possível determinar o valor de Z (344,8 $mg.L^{-1}$), que é a variação na concentração de HClO, em $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre (CRL), necessária para reduzir em 90 % o valor de D, em minutos.

Foi possível, assim, determinar a Equação 11, que inter-relacionam o valor de D, em minutos, e a concentração de HClO.

$$D = D_r \times 10^{Cr - C / 344,8} \qquad \textbf{(Equação 11)}$$

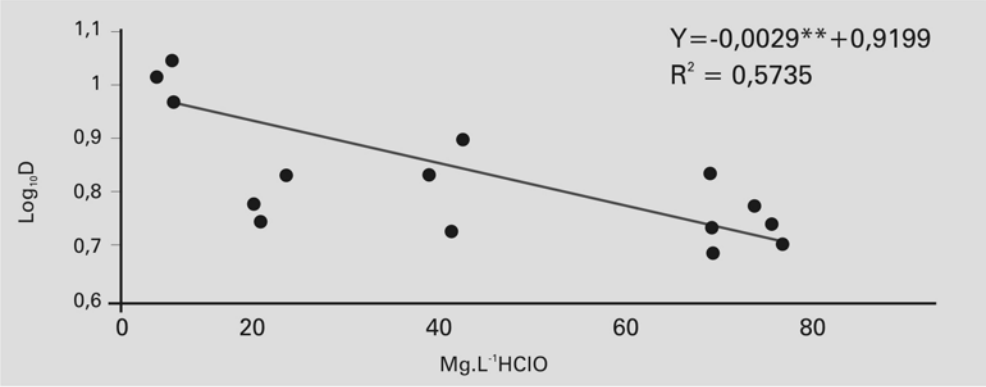
Em que:

D = valor de D, em minutos;

D_r = valor de D de referência, em minutos;

C_r = concentração de ácido hipocloroso de referência, em $mg.L^{-1}$ de CRL; e

C = concentração de ácido hipocloroso, em $mg.L^{-1}$ de CRL.



** Significativo a 1% de probabilidade (P < 0,01).

Figura 14 - Valor de D (min) em função da concentração de ácido hipocloroso.

Considerando, por exemplo, o valor de D_r como de 6,37 min e C_r igual a 40 mg.L^{-1}, tem a seguinte equação:

$D = 6{,}37 \times 10^{40-C/344{,}8}$

Essa equação é válida para as concentrações de ácido hipocloroso entre 1,68 e 75,59 mg.L^{-1} (Tabela 27), que foi a faixa estudada neste experimento. Assim, para se obter 3 RD a partir de uma concentração de 50 mg.L^{-1} de HClO, expressa em CRL, o tempo de contato deverá ser de 17,8 min.

Observou-se que não houve diferença significativa ($P \geq 0{,}05$) entre as soluções de ácido peracético e as demais soluções, com exceção do hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1}, pH 9,45 (Tabelas 27 e 28).

Pelos resultados obtidos, nenhum dos sanitizantes atingiu 3 RD, que é o valor sugerido em testes de suspensão para a aprovação desses produtos contra esporos nas condições de uso (GIFFEL et al., 1995). Deve-se ressaltar que não há valor definido para aprovação de sanitizantes agindo sobre microrganismos aderidos, sejam células vegetativas, sejam esporos. No entanto, assim como as células vegetativas aderidas, os esporos aderidos são mais resistentes à ação dos sanitizantes, necessitando de concentrações e tempos de contato maiores para serem eficientes (MOSTELLER; BISHOP, 1993; GIFFEL et al., 1995).

Constata-se, pela Tabela 28, que para se obter 3 RD o tempo de contato dos sanitizantes contra os esporos aderidos variou entre 15,83 e 28,71 min, o qual se encontra dentro de uma faixa considerada adequada para o procedimento de higienização.

Tabela 28 - Valores de RD de esporos de *Bacillus sporothermodurans* para sanitizantes circulados a 1,5 m.s^{-1} por 15 min, à temperatura ambiente (20-25 ºC), no modelo de linha de circulação de leite

Sanitizantes	RD*(min)	3RD**(min)
Água (Controle)	20,36	61,09
Hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 9,45	9,57	28,71
Hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 8,0	5,74	17,21
Hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 7,0	5,28	15,83
Cloramina orgânica a 100 mg.L^{-1} CRT, pH 7,18	5,42	16,25
Cloramina orgânica a 60 mg.L^{-1} CRT, pH 7,18	6,08	18,23
Ácido peracético a 60 mg.L^{-1}, pH 3,4	6,18	18,53
Ácido peracético a 30 mg.L^{-1}, pH 3,7	6,63	19,90

* Valores experimentais.
** Valores estimados.

4. Sistema-Modelo para Avaliação de Adesão Bacteriana e Eficiência Bactericida da Radiação Ultravioleta em Polietileno de Baixa Densidade

A procura por materiais e sistemas mais eficientes para o envase de alimentos coincide com o aumento de pesquisas sobre materiais plásticos adequados ao contato com os produtos alimentícios. Podem ser citados como materiais plásticos mais comumente empregados pela indústria de alimentos o polipropileno, o policarbonato, o poli(cloreto de vinila), o poliestireno e o polietileno de alta e baixa densidades. Este último é utilizado na indústria de laticínios para o envase de leite fluido.

O polietileno é um polímero termoplástico formado pela aglomeração de unidades monoméricas derivadas do petróleo, denominadas etileno (Figura 15). O polietileno de baixa densidade (PEBD) apresenta ponto de fusão em torno de 115 °C, densidade na faixa de 0,91 a 0,94, e índice de refração de 1,51 a 1,52, com alta resistência a substâncias ácidas e alcalinas, sendo um sólido com 50 % a 60 % de cristalinidade (BILLMEYER,1984; MANO,1991).

O impedimento espacial provocado pelas ramificações dificulta um "empilhamento" das cadeias poliméricas. Por essa razão, as forças intermoleculares que mantêm as cadeias poliméricas unidas tendem a ser mais fracas, tornando o polietileno bastante flexível. Como aplicações típicas, pode-se citar o uso na fabricação de filmes plásticos e laminados para embalagens de produtos alimentícios líquidos e sólidos, filmes termoencolhíveis, filmes laminados e plastificados para produtos farmacêuticos e hospitalares, filmes para embalagens industriais e agrícolas, utensílios domésticos, brinquedos, sacos para lixo, revestimento de fios e cabos, tubos e mangueiras (MANO,1991).

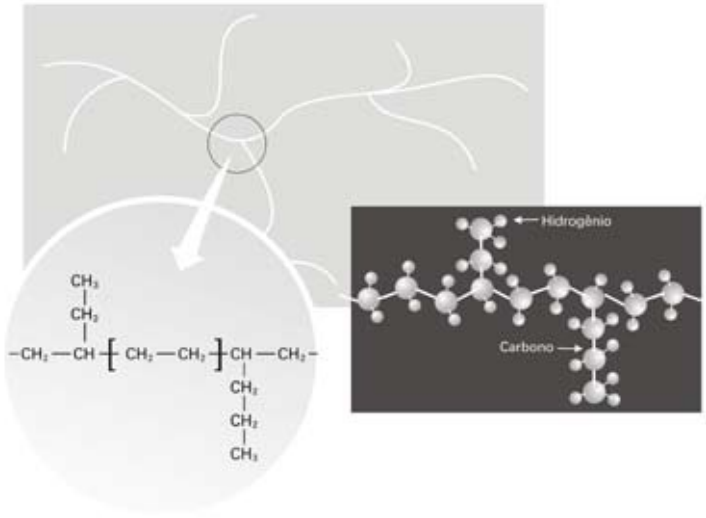


Figura 15 - Estrutura química e espacial do polietileno de baixa densidade.

Na década de 1970, foi introduzida a embalagem de PEBD para leite fluido (ALVES; GARCIA, 1997). Devido à não-resistência dessas embalagens à esterilização pelo calor, métodos foram desenvolvidos para o controle da microbiota desses materiais sensíveis ao calor (TOLEDO, 1975; FLÜCKIGER, 1995).

A radiação UV tem sido usada para redução na microbiota de superfícies de materiais utilizados na embalagem de alimentos, seja em processos assépticos ou não (HUANG, TOLEDO, 1982; YOUSEF; MARTH, 1988; BANWART,1989). No entanto, o uso dessa radiação se estende a outras indústrias, como a farmacêutica e a química (BACHMANN, 1975).

A redução na microbiota de materiais para embalagem empregados em processo contínuo nas linhas de envase é um fator importante para manutenção das características microbiológicas do produto, aumentando, assim, sua vida de prateleira (BACHMANN, 1975; YOUSEF; MARTH, 1988; FLÜCKIGER, 1995). Estudos têm documentado a efetividade da radiação ultravioleta na morte de microrganismos contaminantes de uma variedade de materiais de superfície (ROWAN et al., 1999; SIZER; BALASUBRAMANIAN, 1999). Em testes efetuados com esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, observaram-se entre três e quatro reduções decimais, sendo o experimento conduzido nas seguintes condições: densidade do microrganismo de $1,4 \times 10^4$ UFC.cm^{-2}, 10,5 cm de distância da fonte de radiação, dose de 30.000 μW.cm^{-2} e tempo de irradiação de 1 segundo (FLÜCKIGER, 1995).

O emprego de calor para a esterilização de alguns tipos de embalagem torna o processo caro. No entanto, alguns materiais não resistem ao tratamento com aquecimento, como é o caso das embalagens de polietileno empregadas no envase de leite, entre outros produtos.

Para fornecer subsídios, a fim de um melhor uso da radiação UV pela indústria de laticínios, particularmente no envase de líquidos, foram desenvolvidos dois tra-

balhos, em que se avaliou a eficiência da radiação UV no controle de microrganismos aderidos à superfície do polietileno de baixa densidade.

As condições da indústria foram simuladas por um modelo que reproduz as características e condições do sistema radiação UV da máquina de empacotamento de leite fluido.

O modelo foi construído com chapa galvanizada, apresentando as seguintes dimensões: 10 x 25 x 50 cm (Figura 16). Em seu interior, tem-se uma lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, 15 W de potência, ligada à rede elétrica (127 V) por meio de um reator de 20 W e um starter. A lâmpada está situada a 2 cm acima da canaleta por onde corre o suporte, contendo a embalagem a ser irradiada.

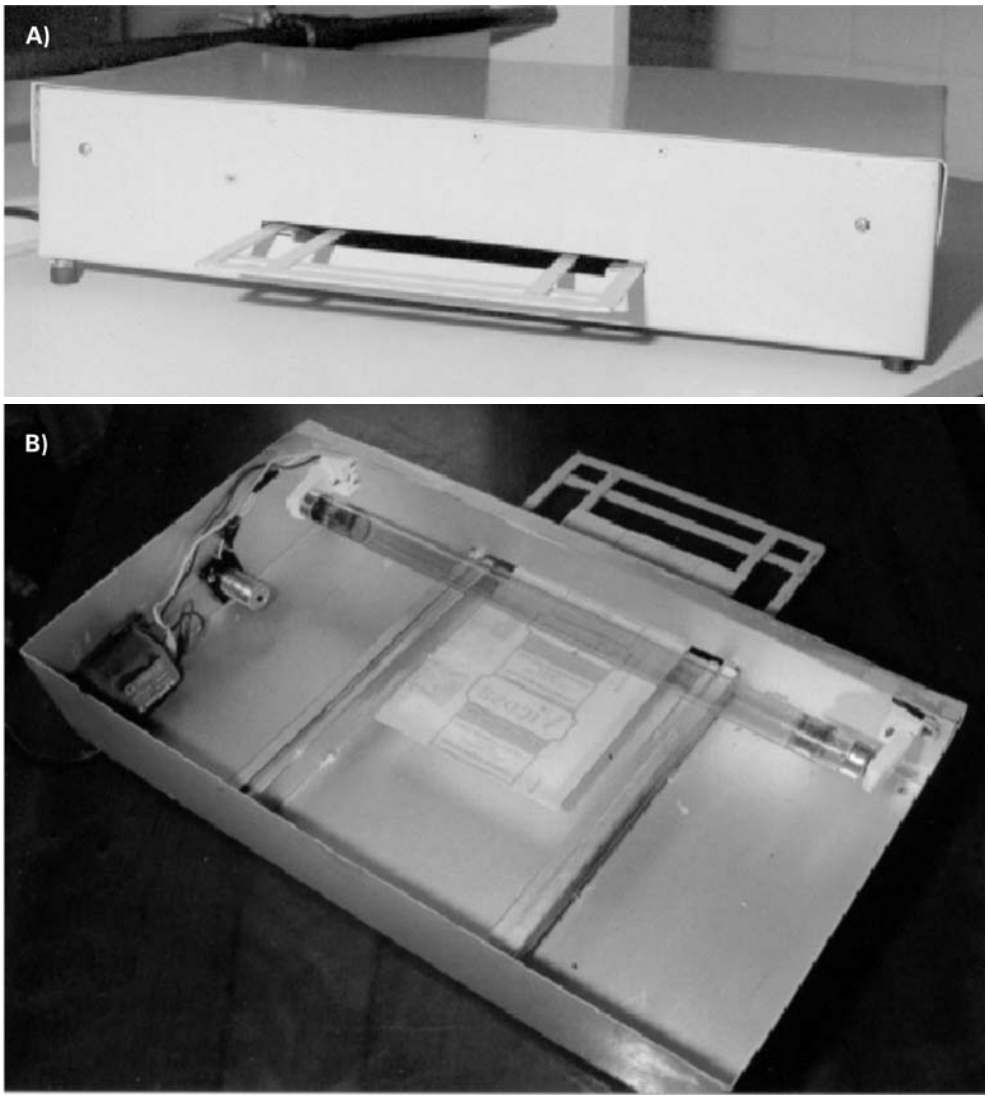


Figura 16 - Modelo para exposição das embalagens à radiação UV; A) aspecto geral e B) componentes do sistema.

4.1 - Adesão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a Polietileno e suas Resistências à Radiação Ultravioleta

Usando o modelo descrito anteriormente (Figura 16), Silva (2000) avaliou a adesão de microrganismos ao polietileno de baixa densidade e a resistência desses microrganismos à radiação ultravioleta, conforme Tabela 29.

Tabela 29 - Síntese do experimento realizado por Silva (2000), que avaliou a adesão de microrganismos ao polietileno de baixa densidade e a resistência desses microrganismos à radiação ultravioleta

Objetivos	1. Avaliar a eficiência antimicrobiana da radiação UV sobre microrganismos-teste aderidos ao PEBD e sobre microrganismos contaminantes de embalagens, em condições industriais 2. Avaliar a eficiência da radiação UV em razão do tempo de uso da lâmpada germicida 3. Analisar a microtopografia do PEBD pela microscopia de força atômica
Microrganismos-teste	*Escherichia coli* K12; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
Superfície	Polietileno de baixa densidade com espessura de 70 μm e área interna de 630 cm^2 (22,5x28 cm), apresentando-se em forma de sacos com capacidade para 1.000 mL
Sanitizante físicos	Sanitização prévia com álcool 70 °GL e radiação ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, por 1 min
Teste	Uso simulado
Delineamento experimental	Parcelas subdivididas com três repetições. Tratamentos principais: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12, na parcela. Tratamentos secundários: temperatura de adesão em dois níveis (8 °C e 18 °C) na subparcela e concentração inicial do inóculo em três níveis (10^5 UFC.mL^{-1}, 10^6 UFC.mL^{-1} e 10^7 UFC.mL^{-1}) na subsubparcela, com três repetições
Análise de resultados	As análises de variância foram realizadas utilizando-se procedimentos do programa Statistical Analysis System - SAS (2007). No estudo da exposição das embalagens, contendo as células aderidas à radiação ultravioleta, realizou-se análise de regressão dos valores experimentais, testando o modelo de 1° grau. Utilizou-se estatística descritiva para comparar os valores e empregou-se análise descritiva para avaliar os resultados obtidos na fase de quantificação da contaminação inicial das embalagens de polietileno, na eficiência da radiação UV nas embalagens sob condições de uso e na influência da redução na intensidade da radiação UV sobre a eficiência bactericida

A) Adesão à Superfície

Após a ativação das culturas de *Escherichia coli* K12 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), diluição do inóculo em tampão-fosfato, 0,31 M e pH de 7,0 ± 0,1, foram obtidas as suspensões nas concentrações de 10^4 UFC.mL^{-1}, 10^5 UFC.mL^{-1} e 10^6 UFC.mL^{-1}.

As superfícies internas de 72 embalagens de polietileno de baixa densidade foram previamente sanitizadas com álcool 70 °GL e expostas à radiação ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, por 1 min. A essas embalagens, adicionaram-se 1.000 mL da suspensão bacteriana. Em seguida à adição das suspensões, as embalagens foram seladas termicamente na seladora TecnoB, modelo S300, e incubadas em estufas tipo BOD, modelo 50A14, às temperaturas de 8 °C e 18 °C por 12 h, para permitir a adesão bacteriana.

Após 12 h de incubação nas temperaturas de 8 °C e 18 °C, as embalagens passaram pelos seguintes procedimentos: i) o tampão empregado na inoculação da embalagem foi escoado, e a essa embalagem adicionaram-se 1.000 mL de tampão-fosfato esterilizado, pH 7,0 ± 0,1, sendo a embalagem deixada em repouso por 1 min, para retirada das células planctônicas; ii) escoado o tampão, a embalagem foi rinsada, empregando-se a agitação manual vigorosa durante 90 seg, com 100 mL de tampão-fosfato esterilizado, para retirada das células sésseis. Após a rinsagem, os tampões contendo as células sésseis foram diluídos conforme necessário, sendo as alíquotas dessas diluições plaqueadas, em profundidade, em PCA; iii) as placas de Petri, após solidificação, foram invertidas e incubadas à temperatura de 35 °C por 24 h, para determinação do número de células aderidas à embalagem. Os resultados foram expressos em UFC.cm^{-2}.

Observa-se, pelas Tabelas 30 e 31, que *S. aureus* e *E. coli* apresentaram capacidade de aderir ao polietileno de baixa densidade em diferentes temperaturas de adesão e a partir de diferentes números iniciais de células. Dependendo do número inicial de microrganismos na suspensão, a porcentagem de adesão para *S. aureus* variou de 0,009 % a 0,106 % a 8 °C e de 0,036 % a 0,107 % a 18 °C. Em *E. coli,* a porcentagem de adesão variou de 0,001 % a 0,006 % a 8 °C e de 0,002 % a 0,028 %, a 18 °C.

Os números de células aderidas por cm^2 não caracterizam um processo de formação de biofilme, já que para isso os valores deveriam estar entre 10^6 e 10^7 UFC.cm^{-2}. Os baixos valores encontrados no experimento com *S. aureus* e *E. coli*, quando comparados com os resultados anteriormente mencionados em aço inoxidável, podem ser explicados pelas características diferentes das superfícies de adesão e pelas diferenças entre células vegetativas e esporos bacterianos. A adesão de esporos é facilitada pela sua alta hidrofobicidade, além da interação que ocorre entre os constituintes químicos da capa dos esporos com as superfícies.

Tabela 30 - Porcentuais e UFC.cm^{-2} de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidos a 8 ºC e 18 ºC, em polietileno de baixa densidade, em razão do logaritmo do número inicial (UFC.mL^{-1}) na suspensão

Logarítmo do número inicial	8 °C		18 °C	
	UFC.cm^{-2}	Porcentual	UFC.cm^{-2}	Porcentual
5,0	2,4 x 10^{1}	0,017	5,4 x 10^{1}	0,038
6,0	1,2 x 10^{2}	0,009	5,1 x 10^{2}	0,036
7,0	1,6 x 10^{4}	0,106	1,5 x 10^{4}	0,107

Tabela 31 - Porcentuais e UFC.cm^{-2} de *Escherichia coli* K12 aderidos, a 8 ºC e 18 ºC, em polietileno de baixa densidade, em razão do logaritmo do número inicial (UFC.mL^{-1}) na suspensão

Logarítmo do número inicial	8 °C		18 °C	
	UFC.cm^{-2}	Porcentual	UFC.cm^{-2}	Porcentual
5,0	1,1 x 10^{1}	0,006	3,0 x 10^{0}	0,007
6,0	2,1 x 10^{1}	0,001	3,3 x 10^{1}	0,002
7,0	2,3 x 10^{2}	0,001	5,6 x 10^{3}	0,028

Nas Figuras 17 e 18 é mostrado o logaritmo de células aderidas, em razão do logaritmo do número inicial de células de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, às temperaturas de 8 °C e 18 °C.

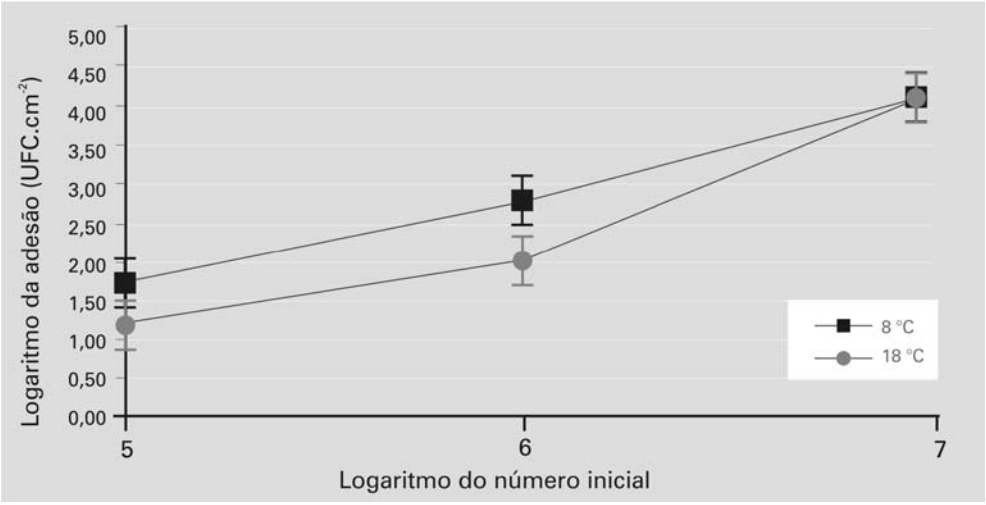


Figura 17 - Efeito das temperaturas de 8 °C e 18 °C no número de células aderidas de *Staphylococus aureus* ATCC 25923, em função do logaritmo do número inicial de células. Média de três repetições.

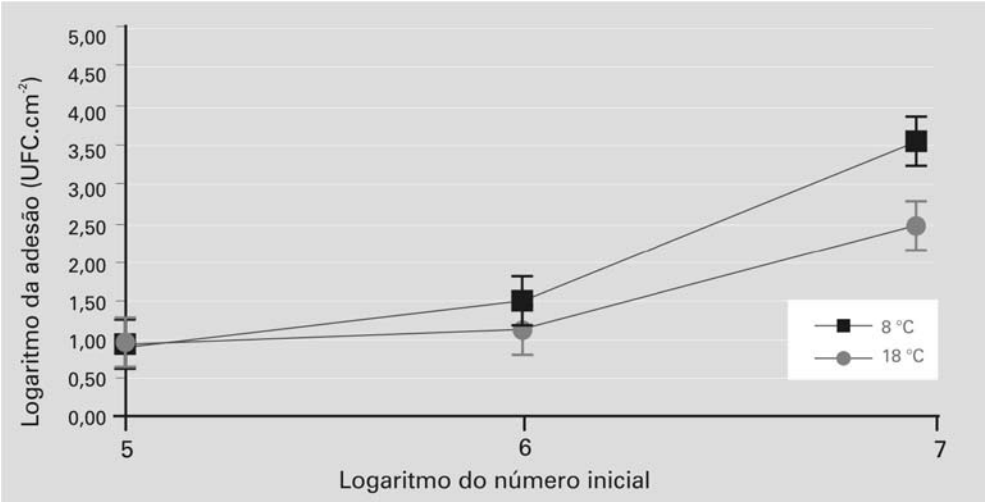


Figura 18 - Efeito das temperaturas de 8 °C e 18 °C no número de células aderidas de *Escherichia coli* K12 em função do logaritmo do número inicial de células. Média de três repetições.

Os resultados demonstram que o aumento na temperatura de 8 °C para 18 °C foi responsável por maior adesão bacteriana ao polietileno, uma vez que a temperatura é fundamental para o desenvolvimento dos microrganismos. Em temperaturas extremas, baixas ou altas, ocorre inativação de enzimas e outras estruturas funcionais da célula, como as membranas (MOAT; FOSTER, 1995). A 18 °C, os microrganismos se encontram mais próximos da faixa de temperatura ótima para crescimento, já que ambos são mesofílicos, ocorrendo, assim, aumento no crescimento microbiano e uma produção de exopolissacarídeos provavelmente maior, elevando, portanto, o número de células aderidas.

Ao comparar os valores de adesão dos microrganismos empregados neste experimento, observou-se maior tendência de adesão das células de *S. aureus*. A 8 °C, a adesão de *S. aureus* nas concentrações iniciais de 10^5 UFC.mL^{-1}, 10^6 UFC.mL^{-1} e 10^6 UFC.mL^{-1} foi de, respectivamente, 2,8; 9,0; e 106 vezes maior que a adesão das células de *E. coli.* Já à temperatura de 18 °C os valores encontrados foram, respectivamente, de 5,4; 18,0; e 3,8.

B) Ação da Radiação Ultravioleta nas Células Aderidas

Após a adesão dos microrganismos na embalagem de polietileno, o tampão de inoculação foi retirado. Em seguida, adicionaram-se 1.000 mL de tampão-fosfato esterilizado, pH 7,0 ± 0,1, à embalagem, ficando esta em repouso durante 1 min, para retirada das células planctônicas. Decorrido o tempo, o tampão foi escoado, e as superfícies internas da embalagem foram submetidas à radiação UV por aproximadamente dois segundos, empregando-se o modelo já descrito. Antes do início

do experimento, a lâmpada permaneceu ligada por 30 min, para estabilização da emissão da luz. Após esse intervalo de tempo, a parte interna das embalagens foi submetida à exposição à radiação UV. Foram adicionados 100 mL de tampão-fosfato esterilizado, 0,31 M, em pH 7,0 ± 0,1, às embalagens irradiadas e agitou-se vigorosamente durante 90 seg, para recuperação das células que resistiram ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Após a rinsagem, os tampões foram diluídos conforme necessário, sendo essas diluições plaqueadas em profundidade, em PCA, e incubadas a 35 °C por 24 h, sendo os resultados expressos em UFC.cm^{-2}.

A eficiência da radiação UV foi determinada por meio de Reduções Decimais (RD), empregando-se a seguinte fórmula: RD=log n_0 - Log n_1, em que: n_0 = número de UFC aderidas ao polietileno por cm^2 antes do uso da radiação ultravioleta; e n_1 = número de UFC aderidas ao polietileno por cm^2 após o uso da radiação ultravioleta.

A intensidade da radiação ultravioleta, expressa em μW.cm^{-2}, emitida pela lâmpada, foi determinada a cada 50 h, até completar o total de 1.500 h de uso. A eficiência bactericida da lâmpada foi determinada em três diferentes tempos: inicial (T70); após 800 h de uso (T800); e com 1.500 h de uso (T1500), empregando-se os procedimentos descritos anteriormente. Foi determinada também a contaminação inicial de aeróbios mesófilos nas embalagens, empregando-se a técnica de Número Mais Provável (NMP), com três séries de cinco tubos, com o uso de volumes de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL, conforme metodologia descrita por Greenberg et al. (1992). Foram analisadas, ao acaso, amostras de polietileno de baixa densidade provenientes de três bobinas, antes e depois da exposição à radiação UV. De cada bobina foram analisados 3.780 cm^2, referentes à área de seis embalagens com 630 cm^2 e capacidade para 1.000 mL. Dessas embalagens, três não foram expostas à radiação UV, e outras três o foram, em condições de envase de leite em um laticínios. Para a retirada das células presentes na superfície interna, adicionaram-se 100 mL de tampão-fosfato esterilizado e pH igual a 7,0 ± 0,1. A rinsagem foi efetuada por meio de agitação manual vigorosa por 90 seg. Após a rinsagem, procedeu-se à diluição dessa solução e à posterior distribuição em três séries de cinco tubos (18 x 150 mm) de ensaio, com capacidade para 15 mL, contendo 10 mL de caldo BHI; a primeira série de tubos apresentava concentração dupla do meio de cultura e as demais séries, concentração simples. Foram utilizados volumes de 10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL da solução de rinsagem das embalagens. As séries de tubos foram levadas à incubação em estufa a 35 °C, por 24 h.

De posse da combinação formada pelo número de tubos positivos em cada diluição e com o auxílio de tabela apropriada, determinaram-se os valores de

NMP.100 mL^{-1}, correspondentes aos 630 cm^2 da superfície interna da embalagem, com 95 % de probabilidade. Na Tabela 32 são mostrados os números de reduções decimais na população dos microrganismos, bem como os respectivos valores de intensidades de radiação estimadas, para *S. aureus* e *E. coli* expostos à radiação UV por 2 segundos. Durante o experimento, o tempo de uso da lâmpada UV foi de cerca de 20 h, quando a intensidade diminuiu de 216 para 175 $\mu W.cm^{-2}$. Assim, para estimar a variação da intensidade da radiação UV, mostrada na Tabela 32, utilizou-se a equação de regressão polinomial, conforme Figura 19.

Tabela 32 - Logaritmo do número de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*, valores de reduções decimais (RD) após 2 segundos de contato e intensidade de radiação UV

Repetições	*Staphylococcus aureus*			*Escherichia coli*		
	Log Ci	RD	$\mu W.cm^{-2}$	Log Ci	RD	$\mu W.cm^{-2}$
1	4,5	0,65	216	5,1	0,26	203
2	4,6	1,00	211	5,1	0,35	203
3	4,7	0,91	209	4,9	0,95	203
Média	4,6	0,85		5,0	0,52	
Desvio-padrão	0,3751					
1	5,6	0,92	198	6,1	0,72	184
2	5,8	0,97	193	6,0	0,63	184
3	5,6	1,80	193	6,1	0,85	181
Média	5,7	1,23		6,1	0,73	
Desvio-padrão	0,1106					
1	6,5	1,96	187	7,2	1,00	175
2	6,9	1,59	179	7,8	1,48	175
3	6,9	1,64	179	7,6	1,62	175
Média	6,8	1,73			1,37	
Desvio-padrão	0,3253					

Log Ci = logaritmo da concentração inicial e RD = reduções decimais

Observou-se que a radiação UV reduz o número de células aderidas à superfície do polietileno de baixa densidade. Em *E. coli*, as reduções decimais médias variaram de 0,52 a 1,37. No caso de *S. aureus*, os valores situaram-se entre 0,85 e 1,73. Constatou-se que há diferença na ação da radiação UV em diferentes concentrações iniciais de células aderidas ao polietileno de baixa densidade e entre os microrganismos estudados.

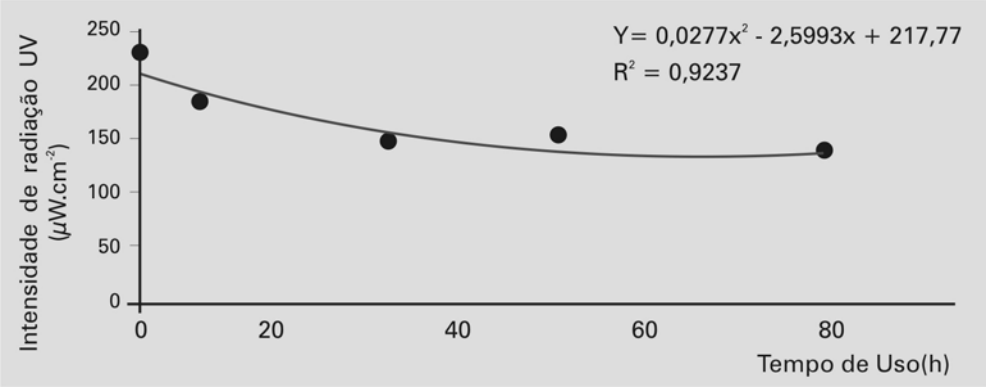


Figura 19 - Diminuição da intensidade de radiação UV nas primeiras 70 h de uso da lâmpada germicida.

Nota-se que, no experimento com *S. aureus*, ocorreu redução na intensidade da radiação UV de 216 para 179 $\mu W.cm^{-2}$ e em *E. coli* a diminuição foi de 203 para 175 $\mu W.cm^{-2}$. No entanto, não houve grandes variações na intensidade nem no número de RD, nas repetições, quando se avaliou o efeito dos números iniciais. Por exemplo, a diferença máxima na intensidade (7 $\mu W.cm^{-2}$) foi constatada em *S. aureus* quando os logaritmos do número inicial eram de 4,5; 4,6; e 4,7. Já em *E. coli* não houve diferença na intensidade quando os logaritmos do número inicial eram de 7,2; 7,8; e 7,6.

Pressupondo que as variações de 216 a 179 $\mu W.cm^{-2}$ e de 203 a 175 $\mu W.cm^{-2}$ não sejam expressivas, observou-se tendência de aumento no número de reduções decimais quando o número inicial de bactérias na suspensão de adesão ao polietileno foi aumentado.

Com o aumento do logaritmo do número inicial de células, observou-se também aumento no número de células aderidas, o que parece ter influenciado a ação da radiação UV. Por exemplo, em números menores de adesão os microrganismos podem apresentar melhor distribuição na superfície, alojando-se em fendas ou locais de difícil acesso à radiação, em virtude da sua topografia, reduzindo, assim, sua eficiência. Como a superfície, provavelmente, apresenta capacidade limitada de proteção às bactérias, a ação da radiação UV será mais eficiente proporcionalmente quando a superfície apresentar maior número de bactérias aderidas.

Para facilitar as comparações sobre a resistência dos microrganismos, já que os logaritmos dos números iniciais eram diferentes no experimento, foram empregadas as equações de regressão linear de *S. aureus* e *E. coli* (Figuras 20 e 21), obtendo-se, dessa forma, os valores apresentados na Tabela 33.

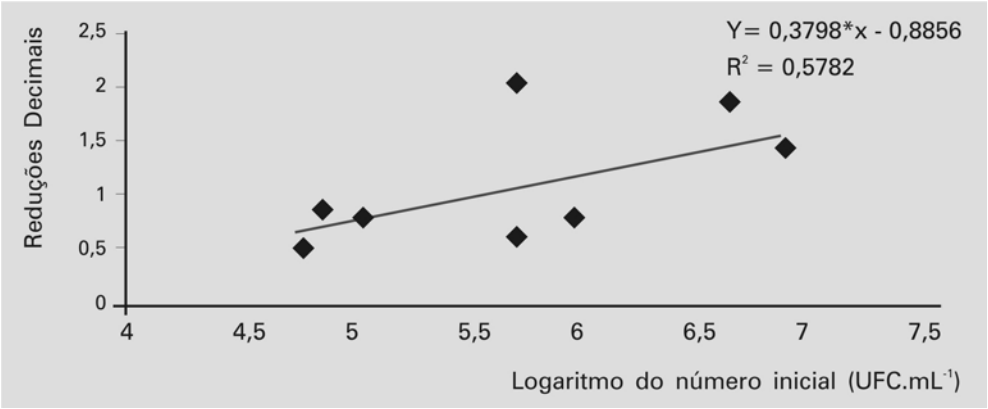


Figura 20 - Regressão linear de reduções decimais em função do logaritmo de número inicial de *Staphylococus aureus* ATCC 25 933, após 2 segundos de exposição à radiação UV.

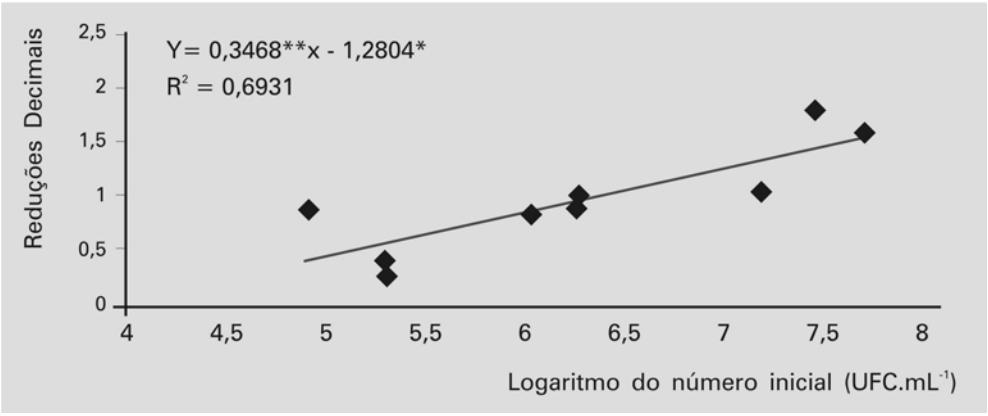


Figura 21 - Regressão linear de reduções decimais em função do logaritmo de número inicial de *Escherichia coli* K12 , após 2 segundos de exposição à radiação UV.

Tabela 33 - Reduções decimais estimadas do número de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 após a exposição à radiação ultravioleta de 216 a 175 μW.cm^{-2}, durante 2 segundos, em razão do número inicial de células aderidas ao polietileno de baixa densidade, obtidas a partir das respectivas regressões lineares

Microrganismo	Logaritmo do número inicial	Reduções decimais
E.coli	5,0	0,46
E.coli	6,0	0,81
E.coli	6,8	1,09
S.aureus	5,0	1,02
S.aureus	6,0	1,40
S.aureus	6,8	1,70

Pode-se observar que, em *E. coli*, quando o logaritmo da concentração inicial foi igual a 5, o valor de RD foi de 0,46; para um logaritmo da concentração igual a 6,8, de 1,09. Para células de *S. aureus*, os valores de RD obtidos nas mesmas concentrações iniciais foram, respectivamente, de 1,02 e 1,70. Esses resultados mostram que as células de *E. coli*, aderidas ao polietileno, apresentam maior capacidade de sobreviver à exposição à radiação UV, quando comparadas com as de *S. aureus.*

Embora a radiação ultravioleta apresente atividade bactericida nos microrganismos aderidos à superfície do polietileno, as reduções obtidas encontram-se abaixo dos valores de três ciclos logarítmicos recomendados em literatura para sanitizantes químicos e físicos na inativação de células aderidas (MOSTELLER; BISHOP, 1993). No entanto, não há dúvida de que a radiação UV é um tratamento auxiliar útil no controle da contaminação microbiológica de embalagens de polietileno.

A comparação dos resultados obtidos com a literatura é dificultada porque vários fatores podem interferir na ação bactericida da radiação UV. Dentre eles, incluem-se o tempo de exposição, a intensidade de radiação empregada, a distância da fonte irradiadora à superfície, a morfologia microbiana, a capacidade de adesão do microrganismo, o estado físico das células e o tipo de superfície onde se encontra o microrganismo.

Neste experimento, a resistência das células vegetativas está associada à adesão à superfície. Por exemplo, uma pesquisa mostrou a redução de 6,3 ciclos logarítmicos para células em suspensão de *Salmonella* Typhimurium, empregando-se a intensidade de 620 $\mu W.cm^{-2}$ em um intervalo de tempo de 15 seg (KUO et al., 1997). Nessa mesma intensidade, quando o experimento foi conduzido com as células no estado séssil, previamente aderidas em casca de ovo, obteve-se redução de três ciclos logarítmicos para 1 min de exposição das células à radiação UV. Em outro experimento, foram obtidos cinco ciclos logarítmicos de redução do número de células de *E. coli* em suspensão, utilizando-se 300.000 $\mu W.cm^{-2}$ por 2,5 seg (BACHMANN, 1975). Isso ocorre em virtude da maior suscetibilidade das células em suspensão à ação da radiação UV. No caso de células aderidas à superfície, os valores de reduções são menores, pois as células apresentam-se fixadas à superfície por meio de exopolissacarídeos, dificultando, assim, a ação da radiação UV devido ao seu baixo poder de penetração.

Deve se considerar, ainda, a topografia da superfície onde as células se encontram aderidas, pois a radiação UV tem pequeno poder de penetração, sendo sua ação restrita à superfície. Desse modo, casca de ovo, superfície de carnes e carcaças de aves, polietileno e aço inoxidável apresentam diferentes tipos de superfícies, com as mais variadas irregularidades, que podem proteger as células do contato direto com a radiação UV, diminuindo, assim, sua ação bactericida.

C) Redução na Intensidade da Radiação UV *versus* a Eficiência Bactericida

Figura 22 ilustra a redução na intensidade da radiação UV com o tempo de uso da lâmpada fluorescente germicida comercial de 15 W. Observa-se, nessa figura, decréscimo acentuado na intensidade da radiação UV nas primeiras 100 h e perda de 39,5 % da intensidade emitida pela lâmpada na faixa de comprimento de onda entre 240 e 260 nm. Essa queda brusca nas 100 primeiras horas de uso também foi relatada por Flückiger (1995), ao analisar uma lâmpada germicida BBC disponível no mercado.

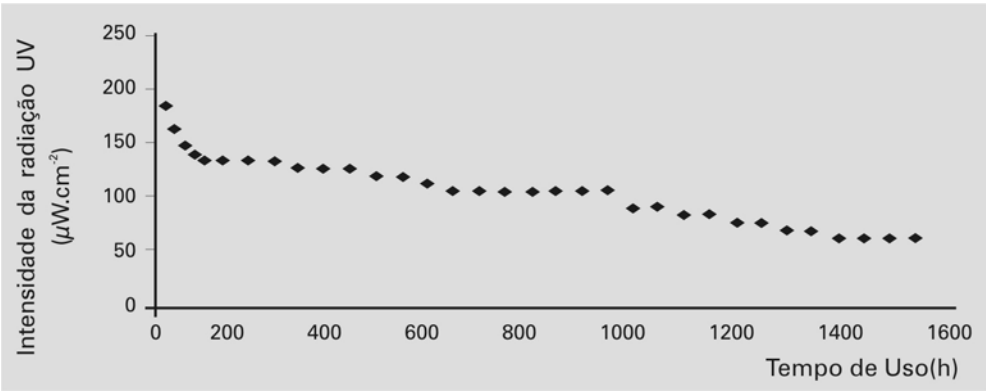


Figura 22 - Redução da intensidade radiação UV com o tempo de uso.

Na Tabela 34, observam-se as reduções decimais obtidas após exposição por 2 segundos à radiação UV de células de *S. aureus* e *E. coli*, em três tempos diferentes de uso da lâmpada.

Tabela 34 - Influência da diminuição da intensidade da radiação UV na eficiência bactericida sobre células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 aderidas intencionalmente a polietileno de baixa densidade

Tempo de uso (h)	Intensidade ($W_{\mu}.cm^{-2}$)	*S. aureus*	*E.coli*
70	144	1,04	0,94
1000	102	0,72	0,58
1500	78	0,58	0,36

Após 1.500 h de uso, o número de reduções decimais em células de *E. coli* aderidas à superfície do polietileno foi de 0,94 para 0,36. Em *S. aureus*, o número reduziu de 1,04 para 0,58. Isso representa uma efetividade 2,6 vezes menor na inativação de células de *E. coli* e de 1,8 vez em células de *S. aureus*, após decorridas 1.500 h de uso. Assim, como esperado, a vida útil da lâmpada germicida é dependente da redução na intensidade com o tempo de uso. Além disso, constatou-se que as células de *E. coli* são mais resistentes à radiação UV do que *S. aureus*. Flückiger (1995) sugeriu vida útil de 1.200 h a 1.500 h para lâmpadas UV comerciais.

As Figuras 23 e 24 mostram a relação entre o logaritmo dos valores de RD e a intensidade de radiação UV em *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

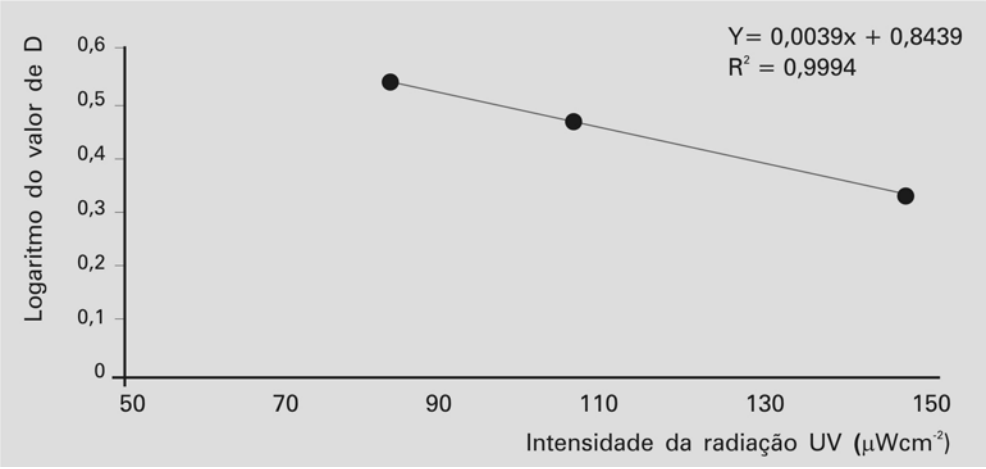


Figura 23 - Relação entre o logaritmo do tempo para 1 RD e a intensidade de radiação UV em células de *Staphylococcus* ATCC 25923.

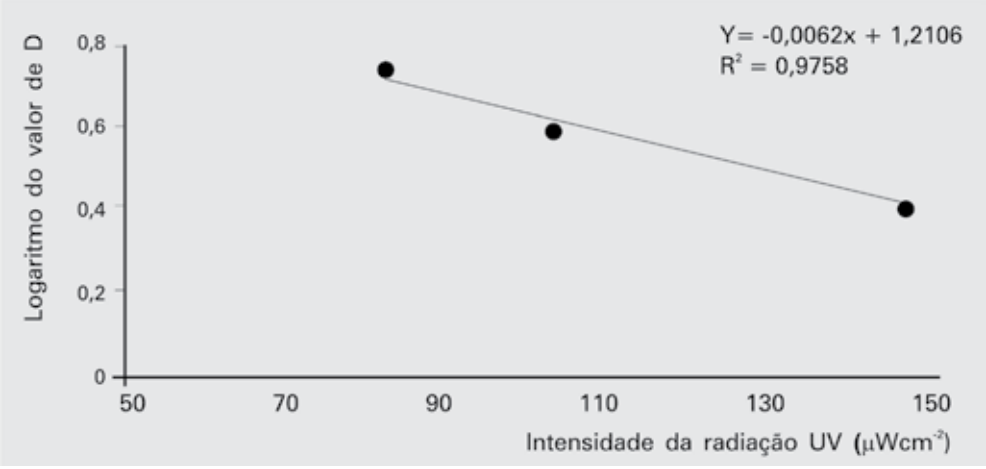


Figura 24 - Relação entre o logaritmo do tempo para 1 RD e a intensidade de radiação UV em células de *Escherichia coli* k12.

D) Avaliação da Radiação Ultravioleta em Condições de Uso

Na Tabela 35 são apresentados os valores de logaritmo do NMP/embalagem (630 cm^2) de microrganismos mesófilos nas embalagens de polietileno antes e depois da irradiação com ultravioleta.

Tabela 35 - Logaritmos dos números de microrganismos mesófilos nas embalagens de polietileno, antes e depois da exposição à radiação UV, em condições de uso, determinados pela técnica de Número Mais Provável (NMP)

Bobina de polietileno	Log do NMP da embalagem não irradiada	Log NMP da embalagem irradiada	Reduções decimais
1	1,47	0,67	0,80
2	2,38	1,23	1,15
3	1,57	0,67	0,90

Os resultados mostram a existência de determinada contaminação microbiológica inicial nas embalagens. Neste experimento, o valor médio de contaminação encontrado nas embalagens antes da exposição à radiação UV foi de 0,16 NMP.cm^{-2}, estando acima do valor recomendado, que é de 0,10 NMP.cm^{-2}. No entanto, após a irradiação das superfícies internas das embalagens por aproximadamente 2 seg, observou-se a sobrevivência de 0,014 NMP.cm^{-2}, o que significa redução decimal de 1,06, isto é, cerca de 90 % das células contaminantes não sobreviveram à ação da radiação UV.

No envase do leite, o risco de contaminação é igual à soma dos riscos de cada etapa do processo, sendo, assim, indispensável o controle rigoroso dessas etapas (FLÜCKIGER, 1995). A efetividade na redução do número inicial de bactérias anterior à embalagem do alimento é um ponto importante no prolongamento da sua vida de prateleira (HUANG; TOLEDO, 1982), bem como na preservação das características sensoriais e higiênico-sanitárias do produto.

E) Topografia da Superfície de Polietileno de Baixa Densidade

Empregou-se microscópio de força atômica (MFA) com a técnica *taping mode*. Nessa técnica, uma ponta, com raio de curvatura entre 5 e 10 nm, é conectada a um oscilador piezoelétrico, sendo forçada a vibrar perto de sua freqüência de ressonância, tocando a superfície da amostra cerca de 500 vezes por ponto de medida. As medidas de alterações na freqüência de vibração, quando a altura da amostra varia, são traduzidas por software, produzindo a imagem da amostra. Essa técnica permite obter alta resolução espacial, e, uma vez que a ponta não fica todo tempo em contato com a amostra, o risco de deformação da amostra pela ponta é minimizado (STRAUSSER; HEATON, 1994).

Ao visualizar a superfície do polietileno por microscopia de força atômica (MFA), observaram-se dois diferentes tipos de superfície, um relativamente liso e outro com pontos refringentes. Nas Figuras 26 e 27 são mostradas a topografia da superfície de polietileno de baixa densidade, observada pela microscopia de força atômica (MFA).

O tipo de superfície apresentada na Figura 27 representa cerca de 50 % da área total analisada.

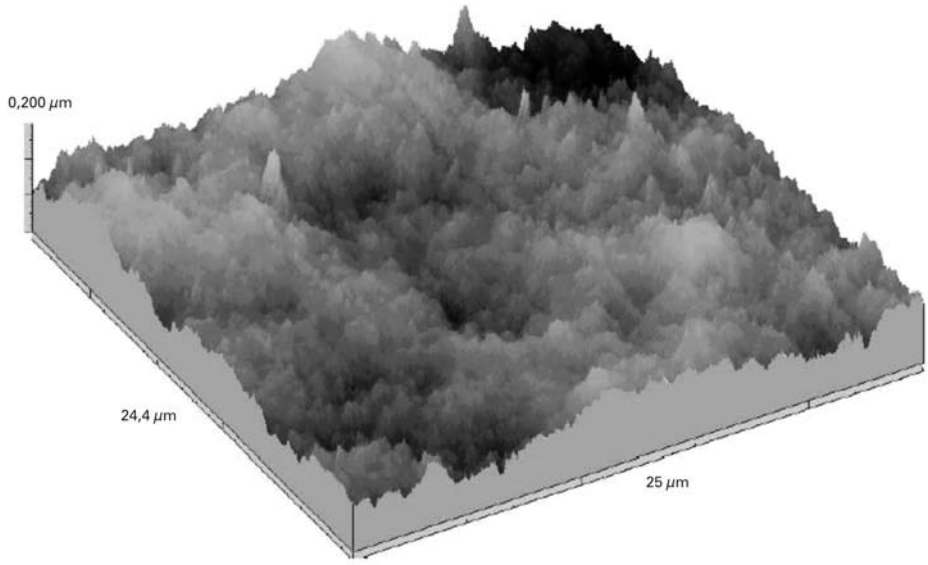


Figura 26 - Fotomicrografia da superfície de polietileno representativa das regiões relativamente lisas, obtida pela microscopia de força atômica.

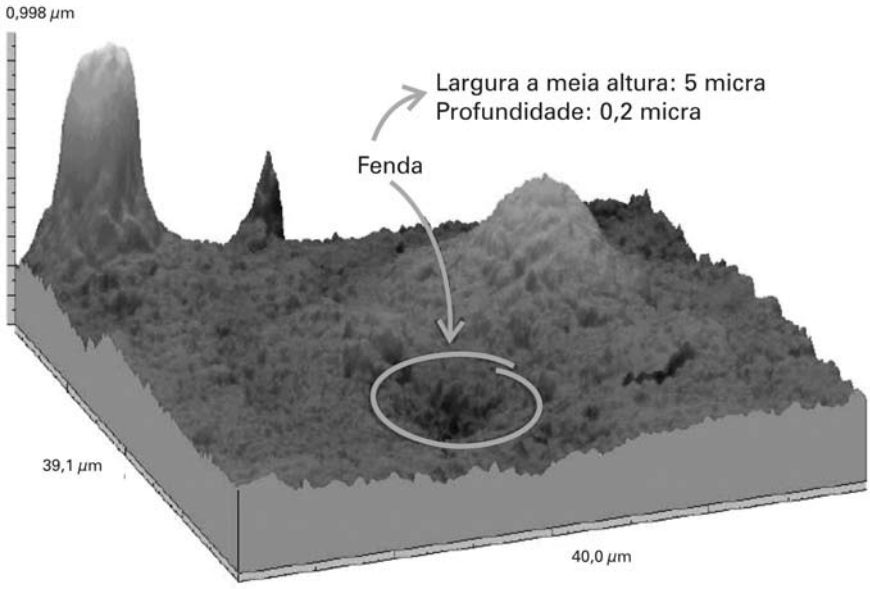


Figura 27 - Fotomicrografia da superfície de polietileno mostrando fendas e elevações, obtida pela microscopia de força atômica.

A presença de rugosidades e contornos no material da embalagem origina sombras que reduzem a efetividade da radiação UV, uma vez que o efeito bactericida ocorre somente na direção do feixe de luz (HUANG; TOLEDO, 1982).

Observa-se, na Figura 26, que a rugosidade média encontrada é de 50 nm, podendo ser considerada uma superfície relativamente plana. Já na superfície mostrada na Figura 27 notam-se imperfeições com 5 μm de diâmetro e 0,2 μm de profundidade. Considerando que as células de *S. aureus* e *E. coli* apresentam as dimensões 0,5-1,5 μm de diâmetro e 1,1-1,5 x 2,0-6,0 μm, respectivamente, as imperfeições da superfície podem proteger esses microrganismos do contato direto com a radiação UV, reduzindo sua eficiência.

Por meio da topografia do polietileno por MFA, pode-se mostrar irregularidades na superfície que possibilitam o alojamento de bactérias, facilitando o processo de adesão, além de dificultar o processo de inativação microbiana de células aderidas, por meio do uso da radiação UV. Essas irregularidades podem impedir a ação da radiação UV por meio de proteção desses microrganismos em fendas e pela presença de elevações, que podem impedir o contato direto do microrganismo com a radiação UV.

4.2 - Adesão de *Bacillus sporothermodurans* ao Polietileno e sua Resistência à Radiação Ultravioleta

Usando o mesmo modelo mostrado na Figura17, Cabral e colaboradores avaliaram a ação da radiação ultravioleta sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans* (Tabela 36). Os esporos desses microrganismos aderiram à superfície de polietileno de baixa densidade em valores que variam entre 2,10 e 6,10 %, quando as embalagens foram enchidas com as suspensões contendo 10^5 esporos.mL^{-1}. Esse fato é importante, considerando-se que esse esporo é resistente ao tratamento térmico de UHT e que na embalagem usada para esse produto há uma camada interna de polietileno de baixa densidade.

Adesão dos Esporos à Superfície

Após serem obtidas as suspensões concentradas de esporos de *Bacillus sporothermodurans* a partir de células vegetativas, prepararam-se 1.000 mL de suspensões contendo 10^5 esporos.mL^{-1}, em água destilada esterilizada, conseguindo-se, desse modo, a suspensão de inoculação. A seguir, os microrganismos aderiram à superfície de polietileno, usando-se sacos de polietileno com volume de 1.000 mL. Às embalagens foram adicionados 1.000 mL da suspensão, e estas foram seladas e incubadas.

Tabela 36 - Síntese de experimento realizado por Cabral e colaboradores (2001) que avaliaram a eficiência da radiação UV sobre esporos bacterianos

Objetivos	1. Verificar a capacidade de adesão de esporos do microrganismo-teste em superfície de polietileno de baixa densidade 2. Avaliar a eficiência antimicrobiana da radiação UV sobre esses esporos aderidos em superfície de polietileno de baixa densidade 3. Avaliar a eficiência da radiação UV em virtude do tempo de exposição.
Microrganismos-teste	Esporos de *Bacillus sporothermodurans*
Superfície	Polietileno de baixa densidade com espessura de 70 μm e área interna de 630 cm^2 (22,5 x 28 cm) apresentando-se em forma embalagens com capacidade para 1.000 mL
Sanitizantes físicos	Radiação ultravioleta, com comprimento de onda de 254 nm
Teste	Uso simulado
Delineamento experimental	1. Concentração da suspensão: 10^5 esporos.mL^{-1} Tempo de adesão: 12 h Temperatura de adesão: 18 °C Tempo de exposição à radiação ultravioleta: 2, 10, 15, 20 e 25 segundos 2. Concentração da suspensão: 10^4 esporos.mL^{-1} Tempo de adesão: 12 h Temperatura de adesão: 18 °C Tempo de exposição à radiação UV: 25 segundos

Após o tempo de incubação, as embalagens passaram pelos seguintes procedimentos: i) o tampão empregado na inoculação da embalagem foi escoado; ii) à embalagem foram adicionados 1.000 mL de água destilada esterilizada, sendo a embalagem deixada em repouso por 1 min para a remoção dos esporos que não se aderiram à superfície do polietileno; iii) depois do escoamento do tampão, a embalagem foi rinsada e agitada vigorosamente, durante 90 segundos, para a retirada dos esporos aderidas à superfície do polietileno com 100 mL de tampão fosfato (0,31 M, pH 7,0 +/- 0,1, esterilizado a 121 °C por 30 min) iv) após a rinsagem, as soluções-tampão foram diluídas conforme necessário e plaqueados empregando-se o meio Agar BHI, incubados a 37 °C por 48 h para a determinação do número de esporos aderidos à embalagem.

Após o procedimento de adesão, a superfície externa de uma parte das embalagens foi submetida à radiação ultravioleta. Para isso foram necessários alguns procedimentos: i) retirou-se o tampão de inoculação, acrescentando-se 1.000 mL de solução-tampão fosfato esterilizada, ficando em repouso por 1 min para a retirada dos esporos não-aderidos; ii) escoaram-se o tampão e as superfícies internas da embalagem submetidas à radiação UV por 2 segundos; iii) às embalagens irradiadas foram adicionados 100 mL de tampão-fosfato esterilizado, passando por agitação vigorosa durante 90 segundos, para a remoção dos esporos aderidos; iv) após a rinsagem, os tampões-fosfato foram diluídos conforme necessário, sendo essas diluições plaqueadas em BHI, incubados a 37 °C por 48 h, para a determinação do número de esporos que resistiram ao tratamento com radiação ultravioleta; e v) determinou-se a eficiência da radiação UV por meio do número de Reduções Decimais (RD) na população de esporos na superfície de polietileno, antes e depois do uso da UV, em que: RD = log do número de esporos aderidos ao polietileno por cm^2 antes do uso da UV - log do número de esporos aderidos ao polietileno por cm^2 após o uso da UV.

Os esporos de *Bacillus sporothermodurans* aderiram à superfície de polietileno de baixa densidade (PEBD) em valores que variaram de 2,10 % a 6,10 %, quando suspensões com 10^5 esporos.mL^{-1} foram adicionadas às embalagens. Constatou-se, pelos resultados observados na Tabela 38, a ação da radiação ultravioleta a 102μW. cm^{-2} sobre os esporos de *B. sporothermodurans* aderidos a polietileno de baixa densidade, normalmente utilizados em embalagem de leite. Como esperado, verificou-se uma tendência do aumento da eficiência, quanto ao número de reduções decimais, da radiação ultravioleta sobre esporos quando se aumenta o tempo de exposição da embalagem ao sanitizante físico.

Quando comparadas as células vegetativas aderidas a polietileno de baixa densidade, os esporos de *B. sporothermodurans* apresentam resistência consideravelmente maior à radiação ultravioleta.

Os esporos de *B. sporothermodurans* aderidos a polietileno de baixa densidade apresentam, ainda, maior resistência à radiação quando comparados com esporos de *B. sporothermodurans* suspensos em meio de cultura. Essa maior resistência provavelmente se deva ao fato de que a superfície do plástico é bastante irregular, como pode ser observado na Figura 28, e os esporos aderidos a essa superfície podem ficar protegidos da radiação ultravioleta por essas irregularidades.

Ao contrário do esperado, os valores de D, que correspondem ao tempo de exposição da embalagem à radiação ultravioleta necessário para que ocorra 1RD no número inicial de esporos aderidos ao polietileno de baixa densidade, nos tempos de 2, 10, 20 e 25 seg de exposição à radiação ultravioleta, foram diferentes (Tabela

37 e Figura 28). Uma explicação possível é que à medida que aumenta o tempo de exposição, os esporos que sobrevivem são os mais resistentes. Sabe-se que numa população de esporos a resistência não é homogênea, contendo alguns mais e outros menos resistentes. Assim, se o tempo de exposição da embalagem à radiação ultravioleta for aumentado, a eficiência sanitizante será proporcionalmente menor.

Tabela 37 - Ação esporicida de 102 μW.cm^{-2}, a 254 nm, de radiação ultravioleta após tempos de contato diferentes sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans* aderidos em polietileno de baixa densidade, apos contato de 12 h a 18 °C, com inóculo inicial de 10^5 esporos.mL^{-1}

Tempo UV (segundos)	Inóculo de esporos (UFC.mL^{-1})	Adesão (%)	Reduções decimais (RD)
2	$2,6x10^5$	0,7	0,32
10	$3,8 x10^5$	4,8	1,26
15	$3,2 x10^5$	4,2	1,38
20	$4,5 x10^5$	2,5	1,80
25	$2,8 x10^5$	5,0	2,16

Tabela 38 - Ação esporicida de 102 μW.cm^{-2}, a 254 nm, de radiação ultravioleta durante 25 segundos sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans* aderidos a polietileno de baixa densidade, apos contato de 12 h a 18 °C, com inóculo inicial de 10^4 esporos.mL^{-1}

Repetição	% Adesão	RD	Inóculo
R1	0,94	1,47	$2,6 \times 10^4$
R2	1,00	1,98	$4,5 \times 10^4$
R3	0,70	1,61	$5,1 \times 10^4$

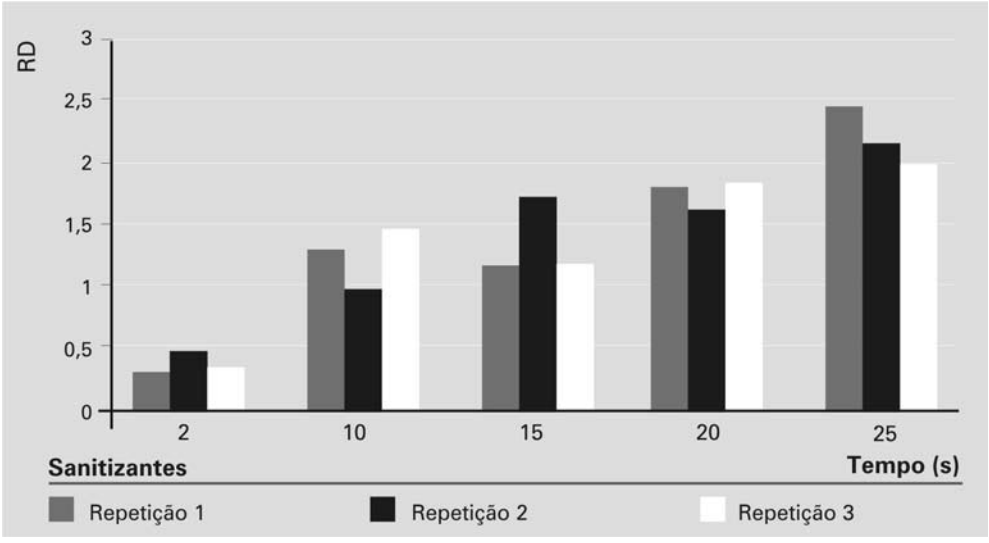


Figura 28 - Reduções Decimais (RD) na população de *Bacillus sporothemodurans* em razão do tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Na Figura 29 é mostrada a equação de regressão linear dos valores de D obtidos de acordo com o tempo de exposição à radiação ultravioleta. Por exemplo, se o tempo de exposição dessa radiação nas condições do experimento for de 8 seg, estima-se que o valor D será de 7,9 seg.

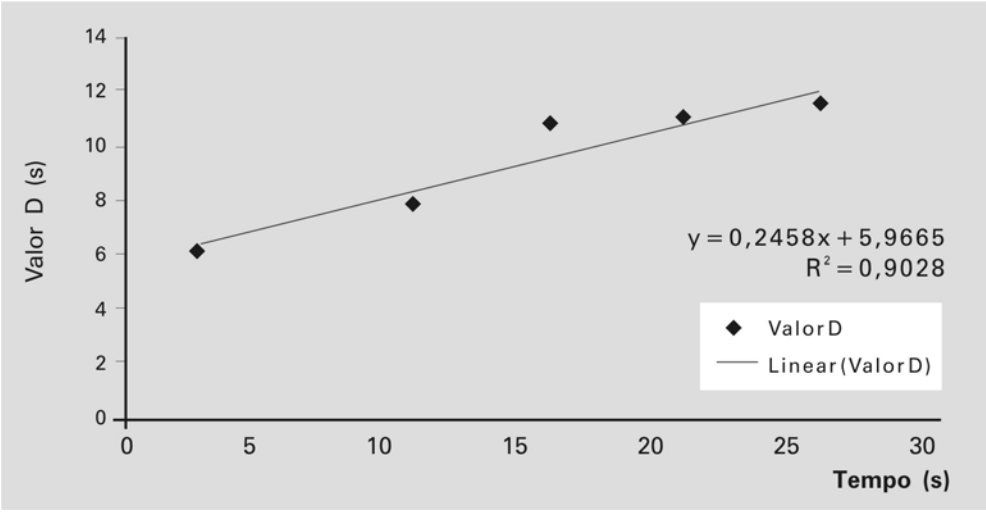


Figura 29 - Valor D para a população de *Bacillus sporothemodurans* em função da exposição à radiação ultravioleta.

5. Conclusão

O desenvolvimento de sistemas, que simulem no laboratório as condições reais do processamento de alimentos, quando bem elaborados, pode oferecer subsídios para uma avaliação dos fatores que afetam a adesão bacteriana, como as etapas do procedimento de higienização; tipos de detergentes e sanitizantes; concentração, pH, temperatura e fluxo das soluções de higienização; espécies microbianas e superfícies, dentre outros.

Referências

AKUTSU, C. K. **Adesão de esporos de Bacillus sporothermodurans ao aço inoxidável e suas resistências a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. Viçosa, MG. UFV, 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa.

ALVES, R. M.V. e GARCIA, E.E.C. **Embalagem para leite fluido: desempenhode filmes flexíveis. Indústria de Laticínios**, p.66-68, 1997

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de Alimentos.** Livraria Varela, São Paulo, 182p. 1996.

APHA. 1992. **"Standard Methods for the Examination of Dairy Products."** 16th ed, ed. Richardson, G. H. Am. Pub. Health Assoc. Washington, D.C.

BACH, J. P.; KROLL, R. G. The differential fluorescence of bacteria stained with acridine orange and the effects of heat. **Journal of Applied Bacteriology**, 71, 51-58, 1991.

BACHMANN, R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. **Brown Boveri Review**, 5, 206-209, 1975.

BANWART, G.J. **Control of microorganisms by destruction**. Basic food microbiology, 2th ed., Chapman & Hall, London, 1989, 748p.

CREMIEUX, A. , FLEURETTE, J. **Methods of testing desinfectants**. In: Block, S.S. (Ed.). Desinfection, sterilization and preservation. 4.ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991. cap. 57, p. 1009-1027.

DYCHDALA, G. R. **Chlorine and chlorine compounds**. In: BLOCK , S.S. (Ed). Disinfectiion, sterilization and preservation, 4th ed. Pennsylvânia, USA, Lea and Febiger, 1991, p1009-1027,

EVANCHO, G.M.; SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; FRANK, J. F. **Microbiological Monitoring of the Foods Processing Environment**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. ed. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th. Chapter. 3, p. 25-35, 2001

FLOH, R. Automatic recirculation cleaning in the 90's . **Dairy, Food Environmental Sanitation**. 13, 216, 1993

FLÜCKIGER, E. **Alternative methods to avoid recontamination during aseptic filling and packaging**. Bulletin of the IDF 300, p.52-56, 1995.

GIESE, J. H. Sanitation: the key to food safety and public health. **Food Technology**, .45, 74-80, 1991.

GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; VAN DAM, W.F.; SLAGHUIS, B. A ; ROMBOUTS, F.M. Sporicidal effect of disinfectants on Bacillus cereus isolated from the milk processing environment, **International Biodeterioration and Biodegradation**. p.421-430, 1995

GREENBERG, A.E., CLESCERI, L.S., EATON, A.D. Ed. **Standard Methods – For Examination of Water and Wastewater**- APHA, 18th ed. Baltimore, 1992.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite.**, Viçosa, MG,2000.76p Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa

HOOD, S., ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, 6, 8-18, 1995.

HUANG, Y.-W., TOLEDO, R. Effect of high doses of high and low intensity UV irradiation on surface microbiological counts and storage-life of fish. . **Journal of Food Science**, 47, 1667-1669, 1982.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, 34,179-186,1997

KUO, F. L.; CAREY, J.B. ; RICKE, S. C. UV irradiation of shell eggs: effect ofpopulations of aerobes, moulds and inoculated Salmonella typhimurium.**Journal of Food Protection**, 60, .639-643, 1997.

McCABE, W. L.; SMITH, J.C.; HARRIOT, P. **Unit operations of chemical engineering.** 5th ed. New York : McGrae-Hill, 1130p, 1993

MAFU, A.A., ROY, D., GOULET, J., MAGNY, P. Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, 53,742-746, 1990.

MANO, E.B. **Polímeros como materiais de engenharia**, 1ª ed, Edgard Blücher São Paulo, 1991, 356p.

MELLO, C. A. **Avaliação da eficiência de sanificantes químicos em condições de uso simulado sobre psicrotróficos acidificantes.** Viçosa, UFV, Minas Gerais, 1977, 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W. **Microbial Fisiology.** 3a ed. New York, Willwy- Liss, 1995, 580p

MOSTELLER, T.M., BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, 56, 34-41, 1993.

PASSOS, M.H.C.R. **Estudo da dispersão de depósitos incrustantes obtidos em pasteurizadores de leite por detergentes ácidos e alcalinos: influência do pH, tempo e temperatura de reação.** Campinas, Unicamp, 1992. 136p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. UFV

RONNER, U.; HUSMARK, U.; HENRIKSSON,A. Adhesion of Bacillus spores in relation to hydrophobicity. **Journal Applied Bacteriology**, 69, 550-556, 1990

ROWAN, N. J., MacGREGOR, S. J., ANDERSON, J.G., FOURACRE, R. A., McILVANEY e FARISH, O. **Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms.** Applied and Environmental Microbiology, 65, 1312-1315, 1999.

SILVA, C. A. S. **Avaliação da radiação ultravioleta no controle de microrganismos aderidos em filmes de polietileno de baixa densidade.** Editora UFV, Viçosa, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV). Universidade Federal de Viçosa.

SIZER, C. E & BALASUBRAMANIAM, V. M. New intervention processes for minimally processed juices. **Food Technology**, 53, 64-67, 1999.

STONE, L. S.; ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopy of stainless steel finishes used in food processing equipment. **Food Technology**, 39:100 and 112-114, 1985.

STRAUSSER, Y. E.; HEATON, M. G. **Scanning probe microscopy –Technology and recent innovations.** American Laboratory, May, 1994.

TOLEDO, R. T.. Chemical sterilants for aseptic packaging. **Food Technology**, p.102–112., 1975.

YOUSEF, A.E., MARTH,E. H. Inactivation of Listeria monocytogenes by ultraviolet energy. **Journal of Food Science**, 53, 571-573, 1988.

ZOTTOLA, E.A Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry ? **Food Technology**,48, 107-114, 1994.

ZOTTOLA, E. A . **Special techniques for studying microbial biofims in food system.** In: Tortorello, M. L. & Gendel, S. M. Food microbial analysis – new technologies. IFT basic simposium series. Marcell Dekker, INC. Cap. 16 p. 315-3346, 1997

Capítulo 04

Controle da Higienização na Indústria de Alimentos

1. Introdução

2. Fundamentos Básicos de Higienização

- 2.1. Superfícies Usadas no Processamento de Alimentos
- 2.2. Qualidade da Matéria-Prima e da Água
- 2.3. Características dos Principais Resíduos
- 2.4. Agentes Detergentes e Formulações
- 2.5. O Passo a Passo do Procedimento de Higienização
- 2.6. Sanitizantes

3. Avaliação da Eficiência do Procedimento de Higienização

- 3.1. Teste do *Swab*
- 3.2. Método de Rinsagem
- 3.3.Placa de Contato
- 3.4. Sedimentação de Microrganismos do Ar em Meio Sólido
- 3.5. Método da Seringa com Ágar
- 3.6. Método da Esponja
- 3.7. Impressão de Microrganismos do Ar em Meio Sólido
- 3.8. Técnica do ATP - Bioluminescência

4. Referências

Nélio José de Andrade
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
Marcília Santos Rosado

Os conhecimentos sobre os fundamentos da limpeza e sanitização das superfícies contribuem para obtenção de alimentos seguros ao consumo.

1. Introdução

O advento da globalização tem acarretado grandes e rápidas mudanças econômicas, sociais e políticas, ampliando oportunidades de negócios, mas provocando uma competitividade acirrada. As indústrias de alimentos que se incluem nesse contexto têm processado uma quantidade de alimentos cada vez maior, na tentativa de suprir o mercado crescente, buscando sempre o incremento de produtividade. Isso pode gerar diferentes problemas, a exemplo de perdas pós-processamento ou diminuição da vida de prateleira se os métodos de higienização empregados não forem eficazes ou, então, forem negligenciados.

A higienização na indústria de alimentos se insere dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos programas de qualidade como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), visando à obtenção de alimentos seguros, particularmente sob os aspectos relacionados às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos, além de contribuir para a manutenção das características sensoriais e nutritivas desses alimentos. Dentro desse contexto, os profissionais responsáveis pela higienização nos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos devem atuar de forma eminentemente preventiva na busca da melhor qualidade dos alimentos processados, evitando problemas de ordem econômica ou de saúde pública. Para isso, deve-se perseguir constantemente o desenvolvimento educacional do pessoal envolvido através de programas de treinamento continuado, motivando-os e conscientizando-os da importância da realização de forma correta dos procedimentos de higienização.

A implantação de programas de higienização mais rigorosos tem sido uma necessidade na indústria de alimentos. Isso se deve a fatores como o desenvolvimento de novos produtos, as novas tecnologias no processamento de alimentos, as exigências comerciais de novos mercados, consumidores mais exigentes e os relatos de doenças veiculadas por alimentos, particularmente àquelas de origem bacteriana. Todos os processadores de alimentos têm responsabilidade direta sobre a segurança e qualidade de seus produtos. Assim, é fundamental que os responsáveis pela higienização tenham em mente dois aspectos relevantes para o sucesso de um procedimento adequado: a) como fazer e b) como avaliar o procedimento de higienização proposto.

A indústria deve enfatizar o "como fazer" os procedimentos de higienização, enfocando as etapas de pré-lavagem, usos de detergentes, enxágüe e sanitização. Devem ser fornecidas informações que incluem concentração, pH, tempo e temperatura de contato das soluções detergentes e sanitizantes. O "como avaliar" se

fundamenta em análises microbiológicas, ou não, para definir se as condições higiênicas previamente estabelecidas, normalmente associadas com quantidade de microrganismos após a realização do procedimento de higienização, foram atendidas. Por exemplo, a avaliação do procedimento de higienização de equipamentos e utensílios, que entram em contato direto com os alimentos, dos manipuladores que processam os alimentos, do ar dos ambientes de processamento, é uma preocupação constante das indústrias, que necessitam de resultados rápidos para garantir a qualidade dos produtos processados e a segurança aos consumidores. Os resultados dessa avaliação são imediatamente repassados aos controladores de processos para que possam aplicar uma ação corretiva, se necessário.

Nas indústrias de alimentos, a multiplicação e a sobrevivência de microrganismos devem ser controladas nas matérias-primas, nas superfícies de equipamentos e utensílios, nos ambientes de processamento, em manipuladores, em embalagens, na distribuição e no produto final. O monitoramento correto dos procedimentos de higienização permite um controle microbiológico eficiente, e, além disso, registros comprovam se um processo ou manipulação em um ponto crítico de controle está em conformidade com o limite crítico estabelecido no plano APPCC.

Este capítulo tem o objetivo de oferecer subsídios para que os procedimentos de higiene auxiliem a produção de alimentos com a qualidade microbiológica recomendada, especificada ou, ainda, exigida pela legislação vigente.

2. Fundamentos Básicos da Higienização

Práticas higiênicas eficientes são necessárias em todas as etapas da cadeia produtiva dos alimentos. Nas indústrias de alimentos, a higienização inclui as etapas de limpeza e sanitização das superfícies de alimentos, ambientes de processamento, equipamentos, utensílios, manipuladores e ar de ambientes de processamento.

A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais. A sanitização tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos alteradores para níveis considerados seguros.

É necessário que o profissional responsável pela higienização nas indústrias de alimentos tenha sólida base de conhecimentos em diversos aspectos. É importante saber sobre as características, utilização e cuidados com superfícies mais comuns em indústrias de alimentos, como o aço carbono, aço inoxidável, policarbonato, polietileno, plástico, cerâmica, tinta, vidro, louça, alumínio, concreto e borracha. Também são necessárias informações sobre a qualidade da água, a solubilidade, a facilidade de remoção pela ação de água ou detergentes alcalinos ou ácidos e

o efeito do tratamento térmico nos diversos resíduos presentes nas superfícies, como carboidratos, gordura, proteínas e sais minerais. É importante conhecer: i) as funções dos agentes de limpeza, como alcalinos, ácidos, fosfatos, complexantes e tensoativos; ii) as reações físicas e, ou, químicas entre os resíduos e os detergentes durante o procedimento de higienização, como saponificação, emulsificação, molhagem, penetração, suspensão, enxaguagem, abrandamento, solubilização de minerais, solubilidade, corrosividade, segurança e economia; iii) as formulações de detergentes; iv) os métodos para avaliação química dos detergentes; e v) a biodegradabilidade dos detergentes e seus impactos ao ambiente.

Também, são importantes as informações disponíveis sobre sanitizantes físicos, como calor e radiação ultravioleta e sobre sanitizantes químicos que incluem compostos clorados, compostos quaternários de amônio, compostos iodados e clorhexidina. Ainda, com relação aos sanitizantes é necessário conhecer suas funções, suas concentrações de uso, seus modos de ação, como e onde poderão ser empregados e forma correta de prepará-los.

A descrição correta do passo-a-passo dos métodos de higienização manual ou mecânica com enfoque na pré-lavagem, aplicação do detergente, enxágüe, sanitização é fundamental na obtenção de alimentos seguros e de qualidade.

2.1. Superfícies Usadas no Processamento de Alimentos

As superfícies comumente usadas para processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, teflon e vidro, permitem o crescimento microbiano, podendo originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes. Um processo de adesão ocorre quando a contagem de microrganismos na superfície atinge valores entre 10^4 UFC.cm^{-2} e 10^5 UFC.cm^{-2}. Contagens acima desses valores já caracterizam o desenvolvimento de biofilmes, se ocorre a produção de exopolissacarídeos pelos microrganismos.

As características principais das superfícies usadas na indústria de alimentos estão descritas na Tabela 1.

2.2. Qualidade da Matéria-Prima e da Água

A produção de alimentos com qualidade, sem dúvida, inicia-se com as condições higiênico-sanitárias da matéria-prima. Tais condições se relacionam: i) aos aspectos físicos, como a ausência de corpos estranhos, pedras, insetos; ii) aos aspectos químicos, como ausência de resíduos de inseticidas, de fertilizantes e dos próprios agentes de limpeza e sanitização; e iii) aos aspectos microbiológicos, como os níveis adequados de bactérias patogênicas ou alteradoras, fungos filamentosos e leveduras. Matérias-primas que não atendem às especificações para o processamento não devem ser aceitas pela indústria de alimentos. Se as matérias-primas

contêm contaminantes que não podem ser reduzidos em níveis aceitáveis também não podem ser processadas.

Tabela 1 - Características dos principais tipos de superfícies usadas na indústria de alimentos

Superfícies	Características	Cuidados
Aço inoxidável	Geralmente resistente à corrosão; superfície lisa e impermeável; resistente à oxidação às altas temperaturas; fácil higienização	É caro. Certas ligas podem ser corroídas por halogênios
Aço-carbono	Detergentes ácidos e alcalinos causam corrosão	Devem ser galvanizados ou estanhados. Usar detergente neutro no procedimento de higienização
Estanho	Corroído por detergente ácidos e alcalinos	Superfícies estanhadas não devem entrar em contato com alimentos
Concreto	Danificado por alimentos ácidos e agentes de limpeza	Deve ser denso e resistente aos ácidos
Vidro	Liso impermeável. Danificado por alcalinos fortes e outros agentes de limpeza	Deve ser limpo com detergentes neutros ou de média alcalinidade
Tinta	Depende da técnica de aplicação. Danificado por agentes alcalinos fortes	Somente algumas tintas são adequadas à indústria de alimentos
Borracha	Não deve ser porosa, não esponjosa. Não ser afetado por agentes alcalinos fortes. Não ser atacada por solventes orgânicos e ácidos fortes	Pode se oxidar por agentes de limpeza
Madeira	Permeável à umidade, gordura e óleo. Difícil manutenção. É destruída por alcalinos fortes	Difícil de higienizar

Por exemplo, frutas e vegetais são cultivados em solos e carreiam aproximadamente 10^9 UFC.g^{-1} de microrganismos após colheita. Dentre esses microrganismos mais comuns na matéria-prima estão bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As bactérias mais freqüentes são *Pseudomonas spp*, *Erwinia herbicola* e *Enterobacter agglomerans*, bactérias do ácido lático como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* spp., as patogênicas como as do gênero *Salmonella* e *Clostridium*, além da estirpe *E. coli* O157: H7. O gênero *Pseudomonas* geralmente é responsável por 50 a 90% da população microbiana de vegetais. Entretanto, outros microrganismos podem se desenvolver durante o transporte, processamento e armazenamento.

A água para uso na indústria de alimentos deve ser considerada como matéria-prima e atender aos padrões físicos, químicos e microbiológicos estabelecidos na legislação brasileira de acordo com a Portaria nº 518, do Ministério da Saúde, de 25 março de 2004. A água é aceita como potável quando se encontra dentro de certos requerimentos de qualidade. Já foram detectados cerca de 2.000 contaminantes diferentes na água.

Aproximadamente, 700 deles foram encontrados em água potável. Isso demonstra a dificuldade em determinar quais as análises devem ser efetuadas para se definir a qualidade da água. Por isso, as entidades e organismos nacionais, como os Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Agência Nacional da Água, ou internacionais, entendem que, na impossibilidade de analisar todos esses possíveis contaminantes, a qualidade da água seja avaliada por determinado número de análises de grupos representativos da qualidade, com a finalidade de ser monitorada. As metodologias analíticas para determinação dos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e de radioatividade devem atender às especificações de entidades nacionais e, ou, internacionais. São amplamente aceitas as metodologias publicadas na edição mais recente do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,* de autoria das instituições *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF), ou as metodologias publicadas pela *International Standartization Organization* (ISO). Algumas legislações vigentes no Brasil sobre uso da água são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Algumas legislações importantes para uso da água na indústria de alimentos

Usos de mananciais	Resolução n° 357, CONAMA, de 17 de março de 2005
Padrões de potabilidade	Portaria n° 518/MS, de 25 de março de 2004
Política nacional de recursos hídricos	Lei n° 9433/997
Sanções penais	Lei n° 9605/1998

A legislação atual prevê a análise cerca de 90 parâmetros, que sem dúvida é um número elevado. As análises propostas fundamentam-se em cinco grupos principais (Tabela 3).

Tabela 3 - Grupos de análises propostos para avaliar a qualidade da água

Grupos	Exemplos de análises
A: Características sensoriais	Cor, sabor, odor e turbidez
B: Riscos à saúde humana	Metais pesados, pesticidas, solventes orgânicos, nitratos, nitritos, microrganismos patogênicos
C: Indicadores de depósitos, incrustações e corrosão	Cobre, ferro, zinco, cálcio, magnésio, cloretos, sulfatos, sílica, bicarbonatos/ácido carbônico, oxigênio
D: Indicadores de poluição	Amônia, nitrito, nitrato
E: Análises microbiológicas	Contagem total de mesófilos, coliformes totais e fecais, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes,* protozoários e microcistinas, dentre outros

O grupo de análises que indicam possibilidades de formação de incrustações e corrosão é representado pelos sais minerais e gases presentes. Esse grupo apresenta

grande importância em processos de adesão microbiana e formação de biofilmes. Os locais onde ocorre corrosão e, ou, depósitos minerais são apropriados ao desenvolvimento de microrganismos. Esses eventos alteram a microtopografia das superfícies que processam alimentos, facilitando a deposição de matéria orgânica, nutrientes e microrganismos. As incrustações desses minerais muitas vezes são denominadas no dia-a-dia da indústria de "pedras". Assim, ocorrem, por exemplo, as formações minerais conhecidas como pedras de leite e pedras de cerveja. No caso de laticínios, essas incrustações são constituídas de minerais da água, principalmente aqueles responsáveis pela dureza, como cálcio e magnésio, minerais dos detergentes e sanitizantes, como sódio, fósforo e cloretos, resíduos de proteínas, gordura, açucares e sais minerais de leite. Além disso, nessas incrustações podem se agregar microrganismos de origens diversas, como aqueles presentes no ar, na água, nos manipuladores e no próprio alimento. Esses microrganismos, encontrando condições favoráveis para seu desenvolvimento, atingem números elevados e, ao se liberarem, contaminam os alimentos processados nessas superfícies incrustadas.

A reação entre compostos de detergentes e os íons cálcio e magnésio presentes na água dura dá origem a precipitados insolúveis, que, para serem eliminados, requerem o uso de detergentes ácidos em maior freqüência e concentração, elevando os custos de produção. Além disso, há significativa redução na eficiência de limpeza de superfícies e equipamentos, em função do decréscimo no poder de ação que os detergentes apresentam quando combinados com água dura. Dessa forma, recomenda-se a inclusão de abrandadores na composição dos detergentes.

A dureza da água, expressa em $mg.L^{-1}$ de $CaCO_3$, pode variar de 10 a 200 $mg.L^{-1}$ em água doce, podendo alcançar até 2.500 $mg.L^{-1}$ em águas salgadas. Esses sais podem ser removidos das águas brutas por abrandamento, desmineralização ou evaporação.

A água é amplamente utilizada em indústrias de alimentos como veículo para aquecimento e resfriamento, limpeza e sanitização de equipamentos, além do seu uso como ingrediente ou como veículo para incorporar ingredientes. Assim, as características físicas, químicas e microbiológicas da água interferem diretamente na qualidade sanitária dos alimentos produzidos, assim como na vida útil dos equipamentos, utensílios e superfícies industriais.

O controle da qualidade da água industrial deve ser realizado sistematicamente, visando atender aos padrões e recomendações existentes. Assim, auxilia a garantia da qualidade sensorial e microbiológica dos alimentos produzidos, na segurança nos processos industriais, na maior eficiência das soluções de limpeza e sanitização e na redução de problemas operacionais devido à formação de depósitos, incrustações e corrosão em superfícies e metais. Além disso, contribui para a redução dos custos de produção em razão da maior vida útil de equipamentos e utensílios.

2.3. Características dos Principais Resíduos

As etapas de um procedimento de higienização que normalmente são propostas para o controle higiênico de superfícies de equipamentos e utensílios, para o asseio pessoal de manipuladores e para o ar de ambientes de processamento, levam em consideração as características de solubilidade dos resíduos de alimentos em água ou detergentes alcalinos e ácidos (Tabela 4). Constata-se, portanto, que a água, associada à ação mecânica, é capaz de remover com alguma facilidade resíduos de carboidratos e sais minerais monovalentes desde que não tenham recebido ação do calor. No entanto, verifica-se a necessidade do uso de agentes alcalinos ou de tensoativos para a remoção de gordura e de ácidos para a remoção de sais minerais divalentes, como o cálcio e magnésio. Os alcalinos também são os agentes responsáveis pela remoção de resíduos de proteína. Deve-se salientar que a ação do calor torna a remoção dos resíduos mais difícil.

Tabela 4 - Solubilidade e ação do calor sobre os principais resíduos de alimentos

Resíduo	Solubilidade	Facilidade de remoção	Efeito do calor
Carboidrato	Geralmente solúveis em água	Fácil	Caramelização
Gordura	Insolúveis em água, solúveis em alcalinos, solúveis por tensoativos	Difícil	Polimerização
Proteínas	Solúveis em alcalinos Solúveis em ácidos	Difícil	Desnaturação
Sais minerais monovalentes (Na^+, K^+)	Solúveis em água	Fácil	Incrustações
Sais minerais divalentes (Ca^{++} e Mg^{++})	Solúveis em ácidos	Difícil	Incrustações

2.4. Agentes Detergentes e Formulações

A limpeza das superfícies é obtida pelo uso de determinados agentes químicos ou por formulações destes que apresentam ação específica sobre os resíduos dos alimentos. As soluções de limpeza podem ser aplicadas: i) manualmente; ii) pela imersão de partes desmontáveis de equipamentos e tubulações, como válvulas conexões e, ainda, para o interior de tachos de tanques; iii) por meio de máquinas lava jato tipo túnel; iv) por meio de equipamento "spray" com alta ou baixa pressão; v) por nebulização ou atomização; vi) pelo uso de espuma; vii) pelo uso de gel; e viii) ou por circulação (*Cleaning In Place* - CIP). Deve-se ressaltar que em indústrias de produtos em pó normalmente se utiliza a limpeza a seco. Nesse caso, os resíduos são removidos por meio de aspiradores, e a sanitização pode ser efetuada pelo uso de tecidos ligeiramente umedecidos com a solução sanitizante.

Os principais grupos de agentes detergentes são representados pelos agentes alcalinos, os ácidos, os fosfatos, os agentes complexantes e os tensoativos. As características e funções principais dos detergentes encontram-se nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 - Funções dos principais agentes de limpeza usados em formulações de detergentes

Agentes	Funções
Alcalinos	Saponificam ácidos graxos. Solubilizam proteínas
Fosfatos	Auxiliam a emulsificação de gordura. Abrandam a água por formação de complexos solúveis com os sais divalentes e auxiliam a suspensão de resíduos
Ácidos	Controlam depósitos minerais. Abrandam a água
Sequestrantes	Abrandam a água por sequestração dos sais divalentes Controlam depósitos minerais. Suspendem resíduos
Tensoativos	Emulsificam resíduos de gordura. Melhoram a ação de molhagem da água. Diminuem a tensão superficial da água

Tabela 6 - Valores relativos de ação de alcalinos e fosfatos

	Hidróxido de sódio	Metassilicato de sódio	Carbonato de sódio	Fosfato trissódico	Hexametafosfato de sódio	Tripolifosfato de sódio	Pirofosatato de sódio	Tetrafosfafo de sódio
Emulsificação	C	B	C	B	A	A	B	A
Saponificação	A	B	B	B	C	C	B	C
Molhagem	C	C	C	C	C	C	C	C
Dispersão	C	B	C	B	A	A	B	A
Suspensão	C	C	C	B	A	A	B	A
Peptização	C	C	C	B	A	A	B	A
Abrandamento da água	C	C	C	A*	A**	A**	A**	A**
Controle de minerais	D	C	D	D	B	B	B	A
Enxágue	D	B	C	B	A	A	A	A
Não corrosividade	D	B	C	C	AA	AA	AA	AA
Irritabilidade	A	A	A	C	B	B	B	C

Legenda : AA = muito elevado, A = elevado, B = médio, C = baixo e D = negativo; * precipitação e ** complexação.

Tabela 7 - Valores relativos da ação de ácidos, complexantes e tensoativos

	Agentes complexantes	Tensoativos	Ácido orgânicos	Ácido inorgânicos
Emulsificação	C	AA	C	C
Saponificação	C	C	C	C
Molhagem	C	AA	C	C
Dispersão	C	A	C	C
Suspensão	C	B	C	C
Peptização	A	B	B	C
Abrandamento da água	AA*	C	A	A
Controle de minerais	A	C	AA	AA
Enxágue	A	AA	B	C
Não corrosividade	AA	A	A	D
Irritabilidade	B	B	B	A

Legenda: AA = muito elevado, A= elevado, B= médio, C= baixo e D= negativo; *complexação.

2.4.1 Alcalinos

Dentre os alcalinos, incluem-se o hidróxido de sódio, o carbonato de sódio, o metassilicato de sódio, o ortossiliciato de sódio e o sesquissilicato de sódio. Todos esses agentes apresentam como característica principal a liberação de íons hidroxila (OH^-) que promovem a saponificação dos ácidos graxos constituintes da gordura e a solubilização dos resíduos de proteína. No entanto, existe diferença na quantidade de alcalinidade liberada em solução aquosa. O hidróxido de sódio é o agente alcalino que libera 100 % de alcalinidade cáustica que é responsável pela sua ação de detergência e por isso é usado amplamente na limpeza pelo método de limpeza no lugar, mais conhecido como CIP (*Cleaning In Place*). Esse método de higienização permite o uso de agentes ou formulações que liberam alta alcalinidade cáustica, temperaturas e tempo de contato das soluções de limpeza mais elevadas e tempo de contato maior. Assim, para limpeza de um pasteurizador de leite, pode-se usar uma solução de hidróxido de sódio contendo 1 % de alcalinidade cáustica, que origina um pH 13, à temperatura de 80 °C, durante 30 min, circulada a uma velocidade de 1,5 $m.s^{-1}$. Nesses trocadores de calor podem ocorrer grossas películas de gordura e proteínas que devem ser controladas por soluções de alta alcalinidade. O hidróxido de sódio é comercializado nas formas de escama, perolados ou líquido e origina soluções que devem ser manipuladas com cuidado, por serem perigosas aos manipuladores.

O carbonato de sódio participa de formulações de média alcalinidade, pois libera em solução aquosa apenas 50 % de alcalinidade cáustica (reações a seguir). Em concentração de 1 % esse agente alcalino origina um pH de cerca de 11. Isso significa que na mesma concentração de 1 % a solução de carbonato de sódio tem 100 vezes menos alcalinidade cáustica do que o hidróxido de sódio. Assim, pode-se usar o carbonato de sódio para formulações usadas na limpeza manual de equipamentos e utensílios.

$$NaOH + H_2O \rightleftharpoons Na^+ + OH^-$$
(100% de alcalinidade cáustica)

$$Na_2CO_3 + H_2O \rightleftharpoons 2Na^+ + CO_3^-$$

$$CO_3^- + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + OH^-$$
(HCO_3^-: 50% alcalinidade de carbonato; OH^-: 50% de alcalinidade cáustica)

Os outros alcalinos que participam de formulações são o metassilicato de sódio, cuja principal característica é atenuar a corrosividade das formulações das quais participa, o ortossilicato de sódio e o sesquissilicato de sódio, que não apresentam a característica mencionada.

A Tabela 8 mostra as principais características desse grupo de agentes de limpeza.

Tabela 8 - Características de substâncias alcalinas comumente usadas no procedimento de limpeza na indústria de alimentos

Nome comum	Nome químico	Fórmula química	pH (solução a 1%)
Soda cáustica	Hidróxido de sódio	$NaOH$	13,1
	Carbonato de sódio	Na_2CO_3	11,2
Sesquicarbonato	Sesquicarbonato de sódio	$Na_2CO_3.NaHCO_3.2H_2O$	9,8
Bórax	Tetraborato de sódio	$Na_2B_4O_7.10H_2O$	9,1
Metassilicato	Metassilicato de sódio	$Na_2O.SiO_2.5H_2O$	12,4
Ortossilicato	Ortossilicato de sódio	$2\ Na_2O.SiO_2.5,5\ H_2O$	12,8
Sequissilicato	Sequissilicato de sódio	$3\ Na_2O.SiO_2.11\ H_2O$	12,6
TSP	Fosfato trissódico	$Na_3PO_4.12H_2O$	11,9

Os íons hidroxilas responsáveis pela alcalinidade cáustica e liberados pelos agentes alcalinos participam efetivamente para a reação de saponificação, que transforma os ácidos graxos insolúveis na água em sabão que é, por sua vez, solúvel em água. A saponificação consiste em reagir o ácido graxo com uma solução alcalina sob aquecimento (Figura 1).

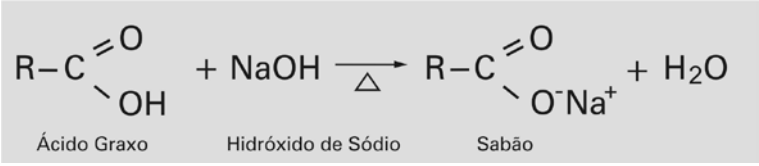


Figura 1 - Reação de saponificação.

Também, os íons hidroxilas pelo aumento do pH da solução auxiliam a remoção de resíduos protéicos. Sabe-se que no ponto isoelétrico as proteínas apresentam carga elétrica livre igual a zero, e nesse caso os resíduos protéicos estão insolúveis em água. Para solubilizá-los, no procedimento de higienização dispõe-se de duas alternativas: diminuição do pH, em que os resíduos protéicos estão carregados positivamente; ou aumento do pH, em que esses resíduos apresentam carga elétrica negativa. Quando se observa a curva de solubilidade de proteína em função do pH (Figura 2), constata-se a maior eficiência das soluções alcalinas. Por exemplo, uma solução alcalina preparada com 1 % de hidróxido de sódio, que corresponde também a 1 % de alcalinidade cáustica, expressa em NaOH, promoverá repulsão eletrostática entre os resíduos protéicos que se apresentam carregados negativamente. Devido a essa

repulsão, esses resíduos se mantêm suspensos em solução aquosa e são removidos da superfície pela etapa de enxaguagem no procedimento de higienização.

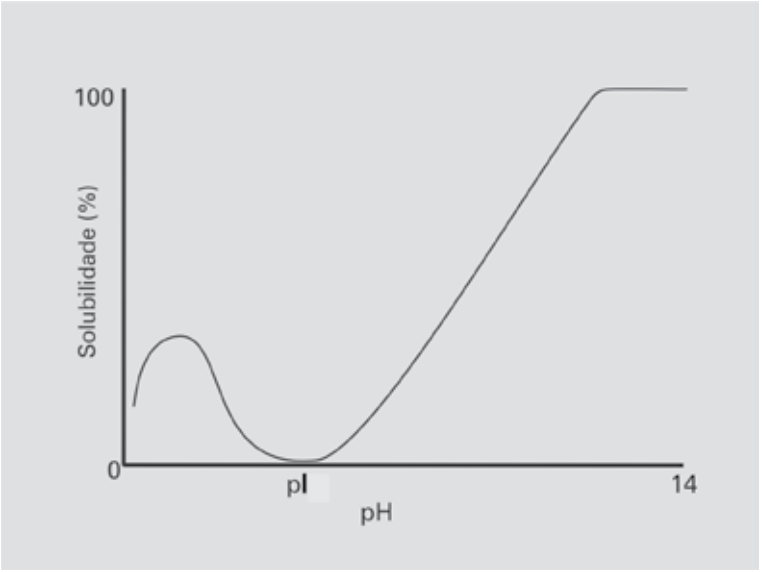


Figura 2 - Efeito do pH na solubilidade de resíduos protéicos.

2.4.2. Ácidos

Os ácidos inorgânicos ou orgânicos têm efetiva participação no controle de sais minerais na superfície de equipamentos e utensílios. Dentre os ácidos inorgânicos, encontram-se o nítrico e o fosfórico. Esses ácidos são corrosivos, por isso, geralmente participam de formulações com inibidores de corrosão, como bases nitrogenadas heterocíclicas e ariltiouréias. Os inibidores aderem à superfície, protegendo-a da ação corrosiva. Esses ácidos normalmente são usados numa concentração de 0,5 % de acidez total, expressa em HCl, que originam pH em torno de 2,0, e na limpeza CIP deve-se usar uma temperatura em torno de 70 °C, para otimizar a detergência do ácido sobre os minerais. Já os ácidos orgânicos são representados pelos ácidos lático, acético, hidroxiacético, tartárico, levulínico e glucônico, dentre outros.

Os ácidos orgânicos são menos corrosivos do que os inorgânicos, porém mais caros. Os ácidos muitas vezes são formulados com tensoativos para diminuir a tensão superficial da solução e melhorar o contato entre o resíduo mineral e o detergente, pois as soluções ácidas não "molham" bem as superfícies.

Esses agentes de limpeza, por exemplo o ácido nítrico, transformam o carbonato de cálcio e o de magnésio, que são insolúveis em água, em nitrato de cálcio

e de magnésio, respectivamente, que são solúveis na água. Essas transformações químicas permitem o controle desses minerais pelo procedimento de higienização, conforme as reações químicas a seguir.

2.4.3. Fosfatos

De maneira geral, utilizam-se o ortofosfato de sódio, representado pelo fosfato trissódico, e os polifosfatos de sódio, representados pelo hexametafosfato, tetrafosfato, tripolifosfato e pelo pirofosfato em suas formas sódicas (Figura 3). Esses produtos ou formulações deles podem ser adquiridos de empresas especializadas, sob diversos nomes comerciais. Como informação, pode-se afirmar que o fosfato trissódico atua por precipitação dos sais de cálcio e de magnésio, responsáveis pela dureza da água, o que não é conveniente, pois haverá depósitos nas superfícies que processam os alimentos. Os polifosfatos, em contrapartida, atuam sobre a dureza por formação de quelatos com os sais, não ocorrendo, portanto, a deposição. A capacidade de quelação é variável em função do polímero. Por exemplo, 1 g de hexametafosfato de sódio é capaz de formar complexos solúveis com cerca de 74 mg de dureza. Outros polifosfatos, como o tripolifosfato de sódio e o tetrafosfato de sódio, complexam, respectivamente, 36 e 57 mg de dureza por grama do seqüestrante.

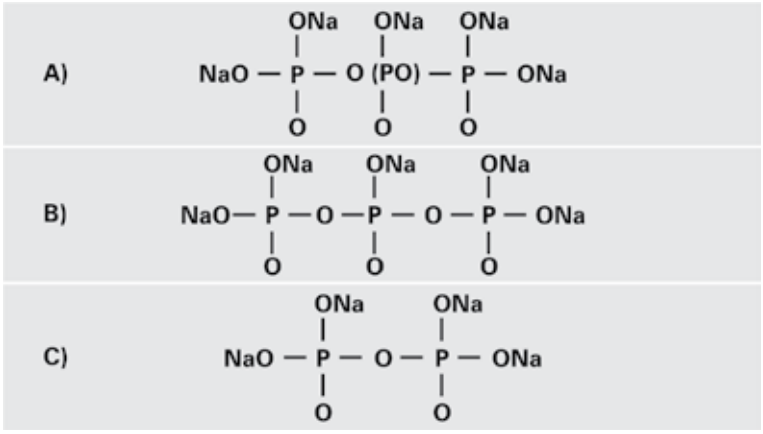


Figura 3 - Exemplos de polifosfatos: a) hexametafosfato de sódio, b) tripolifosfato de sódio e c) pirofosfato tetrassódico.

Mesmo quando a água é classificada como mole, podem ocorrer processos de incrustações em superfícies de troca de calor. Por isso, sugere-se que os detergentes utilizados no procedimento de higienização sejam formulados com agentes complexantes, como os polifostafos.

2.4.4. Seqüestrantes

Os agentes seqüestrantes são representados pelas formas sódicas do EDTA (etilenodiamino tetracetato de sódio), do NTA (nitriloacetato de sódio) e pelo gluconato de sódio (Figura 4). Os agentes têm como função semelhante àquela dos polifosfatos: o controle de depósitos minerais nas superfícies por complexação, atuando sobre cálcio, magnésio, ferro e manganês, dentre outros. No entanto, são muito mais eficientes nessa função (Tabela 9), além de serem mais estáveis em temperaturas elevadas. Porém, são de custo elevado e, geralmente, usados para solucionar problemas específicos. Cada grama do EDTA-Na seqüestra 201 mg de dureza. A mesma quantidade do gluconato de sódio complexa 325 mg de dureza. Deve-se salientar que os ácidos orgânicos, como o glucônico e o cítrico, também apresentam a capacidade de complexar minerais.

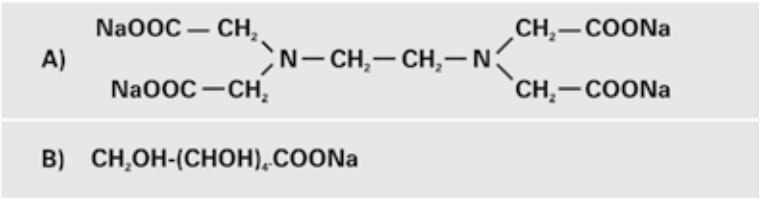


Figura 4 - Agentes seqüestrantes orgânicos: a) etileno diamino tetracetato de sódio e b) gluconato de sódio.

Tabela 9 - Características de substâncias quelantes e seqüestrantes comumente usadas no procedimento de limpeza na indústria de alimentos

Nome químico	Fórmula química	pH (solução a 1%)	mg de $CaCO_3$/g*
Pirofosfato tetrassódico	$Na_4P_2O_7$	10,2	7
Tripolifosfato de sódio	$Na_5P_3O_{10}$	9,7	36
Tetrafosfato de sódio	$Na_6H_2P_2O_7$	8,4	57
Hexametafosfato de sódio	$(NaPO_3)_6$	6,8	74
EDTA-Na	$(Na.COO.CH_2).N.$	11-13	201
Gluconato de sódio	$NaCOO.CHOH\ (CH_2OH)$	<11	25
Gluconato de sódio em NaOH 3%		14	35

*mg de $CaCO_3$ complexado por grama

Por exemplo, na indústria de processamento de leite condensado e fabricação de leite em pó, em que há possibilidade de formação de grossas películas de gordura e proteína contendo minerais e microrganismos, recomenda-se uma formulação de detergente alcalino com 95 % de hidróxido de sódio adicionado de 5 % de EDTA-Na.

2.4.5. Agentes Tensoativos

Os agentes tensoativos também são conhecidos como umidecedores, emulsificantes, detergentes sintéticos e agentes de molhagem, entre outros. A estrutura química de um tensoativo se caracteriza por apresentar uma parte hidrofílica, ou seja, polar e outra hidrofóbica, isto é, apolar (Figura 5). Essa característica permite que esses agentes diminuam a tensão superficial em interfaces líquido-líquído, líquido-gás e sólido-líquido. Tal fato é muito importante para o procedimento de higienização, que para ser eficiente exige a ocorrência de contato entre os agentes de limpeza e os resíduos a serem removidos. Observe o seguinte: a água, ao contrário do que parece, não molha bem a superfície, pois apresenta alta tensão superficial, equivalente a 72 $mJ.m^{-2}$. Essa tensão deve ser diminuída a valores de 36 $mJ.m^{-2}$ para otimizar o contato entre o detergente e o resíduo a ser removido. Por isso, numa superfície onde se encontram resíduos de gordura a água apresenta-se na forma de gotículas, pois a atração entre as moléculas da água é maior do que aquela entre as moléculas de água e as de gordura. Essa diminuição da tensão superficial da água é conseguida com o uso de tensoativos.

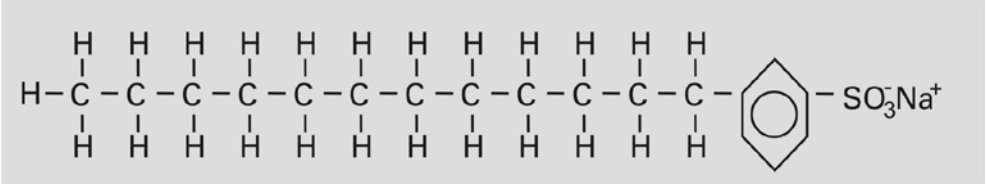


Figura 5 - Estrutura química de um tensoativo: dodecilbenzeno sulfonato de sódio.

Assim, os agentes tensoativos, por serem emulsificantes, permitem a dispersão de dois líquidos não miscíveis e, por serem agentes de molhagem, melhor penetração de líquidos em resíduos sólidos. Os sabões e alguns compostos orgânicos melhoram o poder de penetração das soluções aquosas em fissuras, ranhuras e poros capilares das películas de gordura depositadas nos equipamentos e interpõem-se entre a superfície sólida e os resíduos. Essas substâncias aderem às superfícies das películas dos resíduos sólidos ou líquidos, favorecendo, dessa maneira, a formação de emulsão e dispersão das partículas. De maneira geral, os tensoativos são: i) solúveis em água fria; ii) ativos em concentrações muito baixas, podendo níveis de 0,1 % diminuir a tensão superficial da água em torno de 50 %;

iii) indiferentes à dureza da água, à exceção dos sabões; iv) não formam precipitados; v) atuam em diferentes pH; vi) em alguns casos, são bactericidas; e vii) não são corrosivos das superfícies.

A parte apolar do tensoativo na interface líquido-gás, por exemplo, quando em solução aquosa fica direcionada para o ar e a parte polar para a água. Isso provoca a formação de espuma pelos detergentes (Figura 6a). A ocorrência de espuma pode ser desejável no procedimento de higienização de superfícies externas de equipamentos, silos, paredes e tetos, dentre outros. Nesse caso, a espuma permite melhor contato do detergente com os resíduos a serem removidos e facilita a observação visual da área higienizada. No entanto, o excesso de formação de espuma não é desejável para a higienização pelo processo CIP, devido a dificuldades operacionais. A remoção da espuma em excesso prejudica a etapa de enxaguagem dos resíduos durante higienização. Deve-se ressaltar que a quantidade de espuma formada não é indicativa da eficiência na redução da tensão superficial. Cabe às empresas que formulam os detergentes a escolha adequada das substâncias mais indicadas, em razão do uso na indústria de alimentos. Além disso, deve-se mencionar que a ocorrência de espumas, quando os resíduos de detergentes não são adequadamente tratados pela indústria, torna-se um problema sério de poluição ambiental.

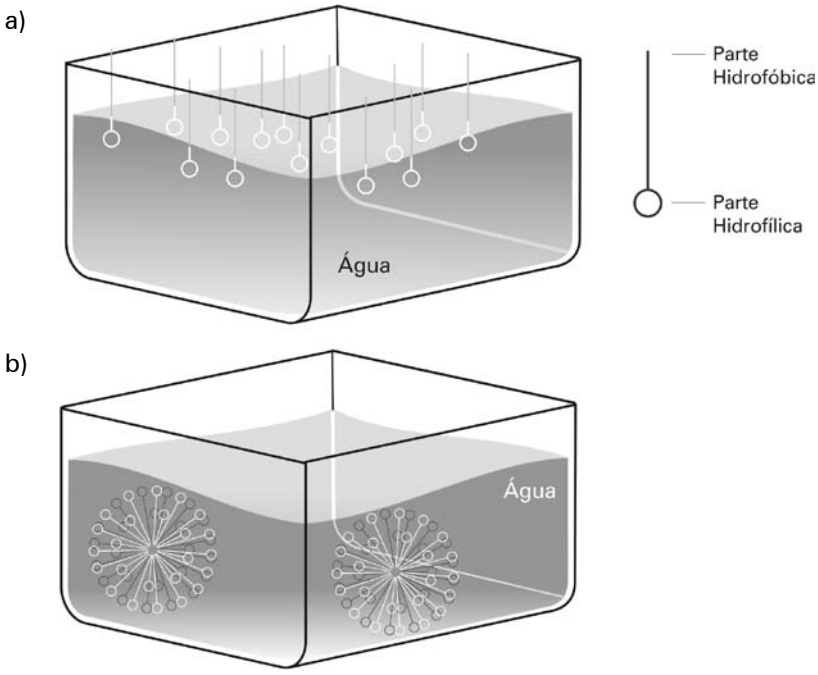


Figura 6 - Interação água e tensoativos.

A molécula do tensoativo forma micela no interior da solução aquosa (Figura 6b). Nesse caso, as partes hidrofóbicas se direcionam para o interior da micela, e as partes polares interagem com a água. É a formação de micela que permite a remoção dos resíduos de gordura pelo processo de emulsificação realizado pelos tensoativos: a parte hidrofóbica dessas substâncias interage com a gordura e ácidos graxos, insolúveis em água e a hidrofílica com as moléculas de água, formando as micelas, que são solúveis em água. As micelas envolvem o resíduo e o suspende em solução aquosa. A concentração de tensoativo em que se inicia a formação de micelas denomina-se "Concentração Crítica de Micela" (CCM). Na CCM, a tensão interfacial está em nível mínimo (Figura 7), e a eficiência de limpeza está otimizada. Aumento na concentração de tensoativo em solução além do CCM não causará diminuição da tensão superficial. No entanto, excesso de tensoativo é necessário para manter a CCM, desde que o tensoativo reage com o resíduo a ser removido.

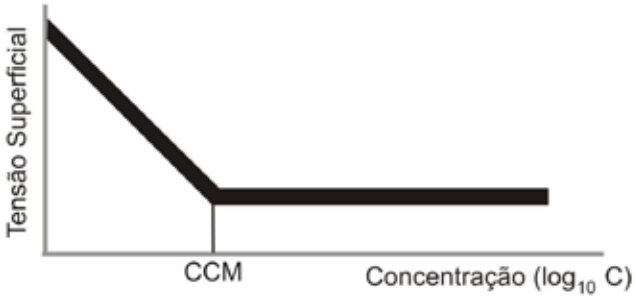


Figura 7 - Tensão superficial em função da concentração de tensoativo.

Assim, manter concentração suficiente de moléculas de tensoativo para a formação de micelas é importante para se obter uma boa limpeza. Essa concentração varia de acordo com o tipo de tensoativo. Por exemplo, a concentração de alquil sulfonatos, como o dodecilbenzeno sulfonato de sódio, deve situar-se entre 0,1 % e 0,2 %. Esse tensoativo tem um CCM de aproximadamente 0,03 %.

Há uma classificação dos agentes tensoativos baseada na sua ionização em solução aquosa. Os tensoativos aniônicos liberam uma carga elétrica negativa em água e são representados pelos sabões obtidos pela saponificação de ácidos graxos com cadeia de 12 a 18 átomos de carbono ou por compostos sintéticos geralmente de origem petroquímica, como é o caso do dodecilbenzeno sulfonato de sódio.

O sabão não é usado para a higienização de superfícies de equipamentos e utensílios por originar odores indesejáveis e, principalmente, por ser inativado pelos sais presentes na água, particularmente os de cálcio e magnésio, responsáveis pela dureza da água. Com o objetivo de solucionar esse problema, a indústria química desenvolveu substâncias que não são afetadas pela água dura, como o dodecil-

benzeno sulfonato de sódio, já mencionado. No entanto, é necessário e obrigatório pela legislação vigente que a indústria de alimentos utilize compostos sintéticos que sejam biodegradáveis. Nesse caso, devem apresentar somente cadeia carbônica linear, de modo a permitir a ação microbiana para sua degradação.

Os tensoativos aniônicos geralmente formam bastante espuma o que pode ser indesejável em formulações de detergentes usados em limpeza CIP. No entanto essa característica é desejável em procedimentos de higienização de superfícies externas de equipamentos, tanques e silos de armazenamento.

Os primeiros tensoativos aniônicos comerciais surgiram por volta de 1930, destacando-se o grupo denominado alquil sulfato de sódio, sintetizados pela sulfonatação de álcoois de cadeia longa (Figura 8).

Figura 8 - Síntese de um alquil sulfato de sódio.

Posteriormente, o grupo denominado alquil benzeno sulfonatos de sódio foi desenvolvido, tendo como fórmula geral: R-SO_3 Na . Deve-se observar que o grupo alquil (R) dá as características de biodegradabilidade do tensoativo. Um tetrapropileno que apresenta carbonos terciários e quaternários não será degradado completamente pelos microrganismos. Por isso, o uso de grupos alquil de cadeia linear na síntese desses tensoativos, com carbonos primários e secundários, é a alternativa viável, já que serão tensoativos biodegradáveis.

Os tensoativos aniônicos incluem os alquil aril sulfonatos, como o dodecilbenzeno sulfonato de sódio, os álcoois sulfatados de cadeia longa, as olefinas sulfonatados e éteres sulfatados (Figura 9).

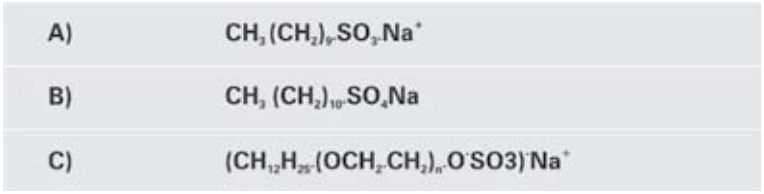


Figura 9 - Exemplos de tensoativos aniônicos: a) dodecilbenzeno sulfonato de sódio, b) lauril sulfato de sódio e c) lauril etoxilato sulfato de sódio.

Os agentes tensoativos catiônicos são aqueles que liberam carga elétrica positiva em solução aquosa. São representados pelos compostos quaternários de amônia, também conhecidos como “quats”, cuja função bactericida é mais importante do que a ação como detergente.

Os agentes não iônicos usualmente resultam da condensação do óxido de etileno ou do óxido de propileno com álcoois de cadeia longa ou alquil fenóis (Figura10).

Não liberam carga elétrica em solução aquosa. No entanto, apresentam uma porção polar e outra apolar em sua molécula química, que lhes conferem as características de agentes tensoativos. Algumas substâncias tensoativas desse grupo não formam muito espuma, embora sejam muito eficientes na diminuição da tensão superficial da água e assim participam de formulações para serem usadas em procedimentos de higienização pelo método CIP.

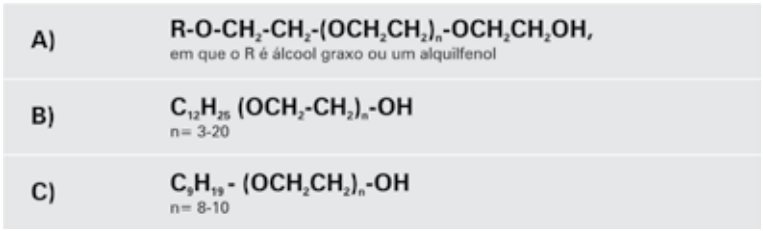


Figura 10 - Exemplos de tensoativos não iônicos: a) fórmula geral de um tensoativo não-iônico, b) lauril álcool etoxilato e c) nonil fenol etoxilato.

Os tensoativos anfóteros liberam carga elétrica negativa ou positiva, dependendo do pH da solução aquosa (Figura 11). Esses agentes apresentam aplicação limitada na formulação de detergentes usados na indústria de alimentos. No entanto, são bastante utilizados na preparação de "shampoos".

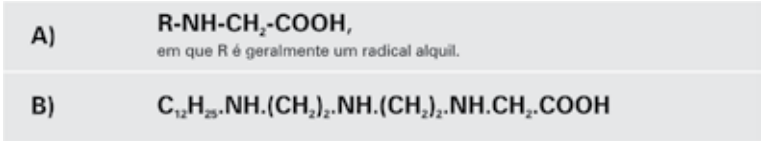


Figura 11 - Tensoativos anfóteros: a) fórmula geral e b) dodecil diaminoetilglicina.

Há mais de uma centena de agentes tensoativos que podem ser classificados nas cinco categorias mencionadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Grupos químicos e características de agentes tensoativos

Grupo químico	Características
Álcoois sulfatados	Boa detergência. Pouca emulsificação. Ligeiramente inativados pela água dura. Maioria produz muito espuma
Hidrocarbonetos sulfatados	Menor detergência, mas melhor eficiência de molhagem do que os álcoois sulfatados
Sulfatos de polieter-aril-alquil	Excelentes detergentes. Estáveis em soluções alcalinas e em água dura. Formam muita espuma
Amidas sulfonatadas	Excelentes detergentes. Estáveis em ácidos, em alcalinos e em água dura. Resistem à oxidação. Formam muita espuma
Alquil aril sulfonatos	São excelentes detergentes. Estáveis em alcalinos e ácidos. Formam muita espuma. Pertence a esse grupo o dodecilbenzeno sulfonato de sódio de cadeia linear, portanto biodegradável

2.4.6. Enzimas

Em algumas situações, com o objetivo de aumentar a eficiência do procedimento de higienização, sugere-se a adição de enzimas proteolíticas e lipases às soluções de tensoativos. Na indústria de carnes, por exemplo, a utilização dessas enzimas seria viável, pois películas de proteínas e gordura podem se depositar sobre superfícies de processamento. Os detergentes contendo as enzimas hidrolisam as gorduras e proteínas, facilitando sua remoção posterior. O uso das enzimas não requer água quente, que, ao contrário, pode inativá-las. Além disso, normalmente as enzimas atuam melhor em meio neutro ou ligeiramente alcalino. Assim, a eficiência das enzimas em formulações de detergentes de alcalinidade cáustica muito elevada deve ser bem avaliada.

2.4.7. Formulações de Detergentes

Um detergente apropriado ao uso no procedimento de higienização na indústria de alimentos deve ser eficiente nas condições de uso, não corroer ou danificar equipamentos, não afetar as características sensoriais dos alimentos, ser facilmente rinsados das superfícies e seguro aos manipuladores.

Espera-se que um detergente ideal apresente as características de: i) saponificação; ii) emulsificação; iii) molhagem; iv) penetração; v) diminuição da tensão superficial; v) solubilização de proteína; vi) manutenção dos resíduos em suspensão; vii) controle de minerais; viii) não ser corrosivo e ix) ser de baixo custo.

Considerando que não há uma única substância que apresente todas essas características desejáveis, a indústria de alimentos utiliza-se de formulações que sejam adequadas ao procedimento de higienização a ser seguido. Como exemplo, algumas formulações serão mencionadas a seguir. No entanto, deve-se salientar que a melhor orientação para a indústria de alimentos é a aquisição de detergentes formulados por empresas especializadas, idôneas e de nome reconhecido no mercado. Essas empresas geralmente oferecem produtos que apresentam bons resultados quando as recomendações técnicas de uso são seguidas corretamente. A formulação preparada pelas próprias empresas somente é viável se nelas existir uma capacidade tecnológica instalada, com profissionais capazes de desenvolver, preparar e controlar a qualidade dessas formulações.

A - Exemplo de formulações de detergente em função da dureza da água

Agente químico	Função	Formação de espuma		
		Baixa(%)	Média(%)	Alta(%)
Fosfato trissódico	Precipitar minerais	15	-	10
Carbonato de sódio	Liberar alcalinidade cáustica	10	39	35
Metassilicato de sódio	Liberar alcalinidade cáustica Controlar corrosão	40	20	20
Pirofostato tetrassódico	Complexar minerais	-	40	-
Tripolifosfato de sódio	Complexar minerais	35	-	30
Tensoativo não iônico	Diminuir tensão superficial	-	1	-
Tensoativo aniônico	Diminuir tensão superficial	-	-	5

B - Formulações típicas de detergentes para uso na indústria de alimentos, com relação à formação de espumas

Agente químico	Função	Concentração (%)	
		< 50 mg.L^{-1} (em $CaCO_3$)	> 50 mg.L^{-1} (em $CaCO_3$)
Carbonato de sódio	Liberar alcalinidade (OH^-)	60	33
Metassilicato de sódio	Liberar alcalinidade (OH^-) Inibição de corrosividade	27	20
Tripolifosfato de sódio	Complexar minerais	10	45
Agente tensoativo	Diminuição de tensão superficial	3	2

C - Exemplo de formulação de detergente para limpeza CIP (*Cleaning In Place*)

Agente químico	Função	Concentração (%)
Hidróxido de sódio	Liberar alcalinidade (OH^-)	95
EDTA-Na	Complexar minerais	5

D - Exemplo de formulação de detergente para higienização manual

Agente químico	Função	Concentração (%)
Dodecilbenzeno sulfonato de sódio (LAS) 40%	Diminuir tensão superficial	10
Tensoativo não-iônico	Diminuir tensão superficial Controlar formação de espuma	4
Tripolifosfato de sódio	Complexar minerais Liberar alcalinidade	25
Metassilicato de sódio	Diminuir corrosão	10

E - Exemplo de formulação de detergente para higienização de tubulações de aço inoxidável

Agente químico	Função	Concentração (%)
Tensoativo não-iônico	Diminuir tensão superficial. Controlar formação de espuma	3
Tripolifosfato de sódio	Complexar minerais Liberar alcalinidade	25
Metassilicato de sódio	Diminuir corrosão	10
Carbonato de sódio	Liberar alcalinidade	30
Sulfato de sódio ou bórax	Excipiente	32

F - Exemplo de formulação de detergente para remoção de incrustações minerais

Agente químico	Função	Concentração (%)
Tensoativo não-iônico	Diminuir tensão superficial	0,30
Ácido fosfórico	Controlar formação de espuma Liberar acidez (H^+)	31,00

G - Exemplo de formulação de detergente para higienização de tanques de armazenamento de leite

Agente químico	Função	Concentração (%)
Metassilicato de sódio	Liberar alcalinidade Diminuir corrosão	35
Tripolifosfato de sódio	Complexar minerais	30
Carbonato de sódio	Liberar alcalinidade	35

H - Exemplo de formulação de detergentes para higienização de garrafas de vidro por método CIP

Agente químico	Função	Concentração (%)
Hidróxido de sódio	Liberar alcalinidade	68
Fosfato trissódico	Precipitar sais minerais	4
Carbonato de sódio	Liberar alcalinidade	14
Pirofosfato de sódio	Complexar minerais	8
Metassilicato de sódio	Liberar alcalinidade Diminuir corrosão	6

2.5. O Passo a Passo do Procedimento de Higienização

A descrição correta do passo a passo dos métodos de higienização, seja o manual, seja o mecânico, deve enfocar a etapas fundamentais de um procedimento correto que inclui: a i) pré-lavagem; ii) aplicação dos detergentes; iii) enxagüagens e

iv) a sanitização. Na pré-lavagem, cerca de 90 % dos resíduos solúveis em água são removidos. A temperatura da água é importante, pois se estiver muito elevada pode provocar a desnaturação de proteína; se estiver muito baixa, causa a solidificação de gordura. Assim, é recomendável que a temperatura seja cerca de 5 °C acima do ponto de solidificação da gordura do alimento. Geralmente, temperaturas entre 35 °C e 40 °C atendem à maioria das indústrias.

A lavagem com alcalinos para remoção de resíduos orgânicos, como proteínas e gorduras, deve ser efetuada, quando possível, a cerca de 80 °C. A lavagem com ácido tem a função de remover os sais minerais das superfícies e, quando possível, deve ser efetuada a 70 °C. A temperatura elevada favorece as reações químicas para retirada desses resíduos das superfícies, mas somente pode ser utilizada na higienização pela metodologia CIP. A higienização manual não permite o uso de temperaturas elevadas, por serem danosas aos manipuladores. As enxaguagens removem das superfícies os resíduos reagidos com os detergentes. São realizadas após a limpeza com alcalinos, com ácidos e, às vezes, após o uso de sanitizantes químicos. A sanitização tem a função de controlar os microrganismos pelo uso de agentes físicos, como o calor ou agentes químicos como o cloro.

A título de ilustração, um Procedimento Operacional Padronizado (POP) para a higienização de um pasteurizador pode ser descrito como se segue (Tabela 11).

Tabela 11 - Proposição de um procedimento operacional padronizado para a higienização de um pasteurizador de leite

Imediatamente após uso do equipamento	I) pré-enxaguar com água a 35 °C II) circular detergente alcalino a 1% de alcalinidade cáustica, a 80 °C/20min III) circular água de enxágüe até a reação negativa com fenoftaleína; IV) circular a solução de ácido nítrico a 0,5% a 70 °C/20 min e V) circular água de enxágüe a 70 °C até a reação amarela com metilorange
Imediatamente antes do uso do equipamento	Circular a solução de ácido peracético a 300 mg.L^{-1} à temperatura ambiente (20 °C - 25 °C)
Freqüência	I) após cada ciclo de pasteurização II) quando necessário, desmontar conforme instruções próprias
Monitoramento	Teste de bioluminescência (ATP < 150 URL) na solução de enxágüe após o uso do ácido nítrico

Um exemplo de riscos associados ao procedimento de higienização é mostrado na Tabela12.

Tabela 12 - Riscos de um procedimento de higienização de um pasteurizador de leite

Etapa	Risco
Remoção de resíduos	Se incompleta, afeta a qualidade da higienização
Desmontagem de equipamentos	Se incompleta, afeta a qualidade da higienização
Enxágüe	Água quente: desnatura proteína Água fria: solidifica gordura
Preparo de soluções	Concentrações mais baixas: procedimento de higienização ineficiente Concentrações mais altas: perdas econômicas, corrosão
Aplicações das soluções	Se temperatura baixa, tempo de contato curto (CIP), velocidade das soluções baixa (CIP): a qualidade da higienização é afetada
Soluções sanitizantes	Se concentração baixa, fora do prazo de validade: qualidade da higienização é afetada
Enxágüe intermediário	Pressão e fluxo altos podem originar aerossóis. Processo de enxágüe incompleto ocasiona a presença de resíduos de solução de higienização e a inativação de sanitizantes
Aplicação de sanitizantes	Se tempo de contato curto, temperatura alta ou baixa, ou velocidade baixa (CIP): afetam a qualidade da higienização
Enxágüe final	Se água de má qualidade microbiológica, afeta a qualidade da higienização

2.6. Sanitizantes

A sanitização complementa o procedimento de higienização, assegurando a qualidade microbiológica das superfícies. Deve ser realizada, de preferência, imediatamente antes do uso de equipamento, pois, após as etapas de limpeza, pode ocorrer a multiplicação de microrganismos indesejáveis que não foram eliminados ou, mesmo, a recontaminação ambiental das superfícies. Essa etapa do procedimento de higienização visa à eliminação dos microrganismos patogênicos e à redução dos alteradores em níveis que atendam às especificações previamente propostas. O uso de detergentes diminui a contaminação microbiana das superfícies, mas geralmente há necessidade da aplicação dos sanitizantes para efetivamente atingir as contagens indicadas para que uma superfície seja considerada em condições higiênicas para o processamento de alimentos.

Deve-se selecionar sanitizantes que: i) sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; ii) apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os microrganismos; e iii) sejam estáveis sob variadas condições de uso e que possuam baixa toxicidade e corrosividade. Não existe um sanitizante que apresente todas essas características desejáveis. Assim, é necessário conhecer as propriedades, vantagens e desvantagens de cada sanitizante disponível para que seja selecionado o mais apropriado a cada aplicação específica. É importante saber que a ação dos sanitizantes é afetada pelas características da superfície; pelo tempo e pela temperatura de contato, pela

concentração de uso e pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, pelo pH, pelas propriedades físico-químicas da água e, ainda, por substâncias inativadoras. O tipo e a concentração de microrganismos contaminantes da superfície também influenciam a eficiência do sanitizante. Os esporos são mais resistentes do que as células vegetativas. Certos sanitizantes são mais efetivos sobre bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Outros apresentam boa eficiência contra fungos filamentosos e leveduras, mas não sobre vírus ou cistos de protozoários, como *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Assim, são importantes as informações disponíveis sobre sanitizantes físicos, como calor e radiação ultravioleta e sobre sanitizantes químicos que incluem compostos clorados, compostos quaternários de amônio, compostos iodados, clorhexidina, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, derivados de fenol, álcoois, extrato de semente de *grape fruit* e aldeídos. Ainda, com relação aos sanitizantes, é necessário conhecer suas funções, suas concentrações de uso, seus modos de ação, como e onde serão empregados e a forma correta de prepará-los.

Agentes Físicos

Calor

O calor, quando possível, deve ser o agente sanitizante escolhido: atinge toda a superfície, incluindo pequenos orifícios e ranhuras e não é seletivo contra os microrganismos. A água quente deve ser usada numa temperatura de 80 °C durante 5 min. O ar quente deve ser aplicado a 90 °C durante 20 min. Já o vapor direto, considerado a verdadeira sanitização pelo calor, deve der aplicado o mais próximo possível da superfície durante 1 min. Deve-se ter cuidado na sanitização de tubulações com o vapor, pois a eficiência deste pode ser diminuída em tubulações longas, se a temperatura não for controlada.

Tabela 13 - Condições de uso e mecanismo de ação de sanitizantes físicos mais usados para controle dos microrganismos em superfícies para processamento na indústria de alimentos

Agente físico	Condições de uso	Mecanismo de ação
Vapor	Aplicação direta durante 1 min sobre a superfície	Desnaturação protéica, inativação de enzimas, desorganização dos lipídeos celulares
Água quente	Imersão, circulação ou aplicação direta sobre a superfície a 80 °C durante 5 min	Alteração do RNA e do DNA. Alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, provocando extravasamento de constituintes do citoplasma. Fusão de lipídeos da membrana
Ar quente	Aplicação direta sobre a superfície a 90 °C durante 5 min	Atua por oxidação de substâncias essenciais ao metabolismo microbiano
Irradiação ultravioleta	Aplicação de radiação UV provenientes de lâmpadas germicidas, em 254 nm, sobre a superfície ou ar do ambiente por determinado tempo	A radiação aplicada forma dímeros da base nitrogenada timina, provocando mutação no DNA microbiano

Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta é usada no controle microbiológico em situações específicas de áreas de processamento, de laboratórios, câmaras de repicagens de micorganismos, superfícies de processamento de alimentos, como polietileno usado como embalagem de leite. Também, pode ser usada no controle microbiológico de alimentos. Lâmpadas ultravioleta que imitem radiação 254 nm têm atividade antimicrobiana. Como essa atividade diminui com o uso, as lâmpadas devem ser substituídas periodicamente, em geral após seis meses.

Agentes Químicos

As Tabelas 14, 15 e 16 descrevem as características de uso, eficiência antimicrobiana e mecanismo de ação dos principais sanitizantes químicos.

Tabela 14 - Condições de uso de sanitizantes químicos mais usados para controle dos microrganismos em superfícies para processamento na indústria de alimentos

Agente químico	Concentração ($mg.L^{-1}$)	pH
Hipoclorito de sódio	100	10
Dióxido de cloro	5	7
Cloraminas orgânicas	100	6-7
Iodóforo		
a) Manipuladores	15	5,5
b) Equipamentos e utensílios	15	3
Amônia quaternária	200	7-10
Ácido peracético	60	3
Peróxido de hidrogênio	50000	4
Ácidos mais tensoativos	200	1,6-2,4
Álcool	700000 (70%)	7
Clorhexidina	100	4

Tabela 15 - Eficiência sobre microrganismos de alguns sanitizantes químicos nas condições de uso para controle de microrganismos em superfícies para processamento na indústria de alimentos

	Bactérias		Fungos Filamentosos/Leveduras	Esporos bacterianos	Vírus
	Gram$^+$	Gram$^-$			
Hipoclorito de sódio	+++	+++	++ -	++ -	++ -
Dióxido de cloro	+++	+++	++ -	++ -	++ -
Cloraminas orgânicas	+++	+++	++ -	++ -	++ -
Iodóforos	+++	+++	++ -	+ - -	+ - -
Amônia quaternária	+++	+ - -	+++	- - -	+ - -
Ácido peracético	+++	+++	+++	+++	+++
Peróxido de hidrogênio	+++	++ -	++ -	+++	++ -

Legenda: +++ = Eficaz ++ - = Moderadamente eficaz + - - = Baixa eficácia - - - = Ineficaz

Tabela16 - Mecanismos de ação dos sanitizantes químicos mais usados no controle de microrganismos em superfícies para processamento na indústria de alimentos

Agente químico	Mecanismo de ação mais provável
Hipoclorito de sódio e Cloraminas orgânicas	i) Na forma não-dissociada, penetra através da membrana celular e oxida os grupos sulfidrílicos (-SH) de certas enzimas importantes da via glicolítica, inibindo-a ii) Forma compostos N-clorados tóxicos pela combinação do cloro com proteínas da membrana celular iii) Causa danos à membrana, dificultando o transporte de carboidratos e de aminoácidos, podendo resultar no extravasamento de compostos celulares iv) Provoca a descarboxilação oxidativa de aminoácidos, formando nitrilas e aldeídos v) Reage com DNA, oxida bases purínicas pirimidínicas e paralisa a síntese protéica vi) Inibe a captação de oxigênio e a fosforilação e causa vazamento de algumas macromoléculas vii) É causador de alterações cromossomáticas
Dióxido de cloro	Oxidação de substância essenciais ao metabolismo microbiano
Iodóforo	Oxidação da tirosina de enzimas essenciais e de outras proteínas envolvidas com esse aminoácido. O iodo livre (I_2) reage com grupos fenólicos do aminoácido tirosina, formando monoiodotirosina e diiodotirosina
Amônia quaternária	Interferência nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, levando ao extravasamento de metabólitos. Interferência no metabolismo de proteínas, causando a desnaturação protéica e inibição enzimática
Ácido peracético	Oxidação de grupos sulfidrilas das enzimas. Interferência em processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática
Peróxido de hidrogênio	Oxidação de componentes vitais ao metabolismo microbiano
Ácido mais tensoativo	A forma não-dissociada do ácido atravessa a membrana celular, dissocia-se no citoplasma e abaixa o pH intracelular
Álcool	Desnaturação de proteínas e solubilização de lipídeos, provocando lesões na membrana citoplasmática
Clorhexidina	i) Modificações citológicas e fisiológicas que afetam a membrana celular ii) Reação com fosfatos presentes nas superfícies da membrana celular, provocando extravasamento de compostos de baixo peso molecular como íons de potássio iii) Inibição de enzimas como a adenosil-trifosfatase iv) Formação e precipitação de complexos constituídos por fosfatos e componentes citoplasmáticos, alterando o funcionamento osmótico. Em baixas concentrações, perda rápida de constituintes citoplasmáticos. Em altas concentrações, causa um aspecto coagulado no citoplasma
Triclosan (derivado de fenol)	Alteração da permeabilidade de membrana celular, ocorrendo o extravasamento de constituintes do citoplasma

Compostos Clorados

Os compostos clorados podem ser classificados em inorgânicos e orgânicos. Dentre os primeiros, incluem-se o cloro gás (Cl_2), o hipoclorito de sódio (NaClO), o hipoclorito de cálcio ($CaClO_2$) e o dióxido de cloro (ClO_2). A forma gasosa é amplamente utilizada na desinfecção de água para abastecimento público e industrial, sendo comercializada em cilindros de aço carbono, onde se encontra na forma líquida, apresentando 100 % de cloro residual total, expresso em Cl_2. Em condições de pressão atmosférica, passa ao estado gasoso, forma em que é extremamente tóxico aos manipuladores. Por isso, há necessidade de pessoal bem treinado para sua utilização. Para o procedimento de higienização na indústria de alimentos, o hipoclorito de sódio, ainda, é o mais utilizado, sendo comercializado na forma líquida, em concentrações entre 2 % e 10 % de cloro residual total, expresso em Cl_2. O hipoclorito de sódio apresenta uma série de vantagens comparativas em relação aos outros sanitizantes químicos: i) relativamente baratos; ii) ação rápida; iii) não afetados pela dureza da água; iv) efetivos contra grande variedade de microrganismos, inclusive esporos bacterianos e bacteriófagos; v) efetivos em baixas concentrações; vii) relativamente não-tóxicos nas condições de uso; viii) soluções de fácil preparação e aplicação; ix) concentração facilmente determinada; x) usado em tratamento de água, e xi) os equipamentos não necessitam ser enxaguados após a sanitização, se a concentração de uso for controlada adequadamente. Dentre as desvantagens do uso do hipoclorito de sódio, encontram-se: i) instabilidade ao armazenamento; ii) inativação pela matéria orgânica; iii) corrosão, se não usados corretamente; iv) irritação da pele; v) precipitação em água contendo ferro; vi) menor eficiência em pH mais elevado; e vii) oxidação da borracha, que muitas vezes são componentes de equipamentos, por exemplo gaxetas de pasteurizadores.

Nas indústrias de alimentos, tem aumentado o uso dióxido de cloro. Esse composto clorado é disponibilizado pela sua geração no próprio local de uso, por meio da reação entre o clorito de sódio e o cloro gás. Para isso, deve-se dispor de equipamento que pode ser caro e de difícil manutenção, exigindo pessoas treinadas. Pode ser encontrado comercialmente na forma estabilizada que consiste de uma solução de clorito de sódio, que pode ser convertido para ClO_2 no local de uso pela adição de ácido fosfórico ou cítrico, por exemplo. Umas das principais vantagens do ClO_2 é a sua baixa reatividade com a matéria orgânica, não formando as substâncias denominadas de trihalometanos, que são cancerígenos, como ocorre no caso do cloro gasoso e dos hipocloritos.

Os compostos clorados orgânicos, conhecidos como cloraminas orgânicas, são produzidas pela reação do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas. As mais utilizadas são a cloramina T, a dicloramina T, o diclorodimetil hidantoína, as formas sódicas do ácido dicloroisocianúrico e o ácido tricloroisocianúrico (Figura 12).

Esses compostos se apresentam na forma de pó em teores entre 24 % e 90 % de cloro residual total, expresso em Cl_2. Em comparação com os clorados inorgânicos, liberam mais lentamente o ácido hipocloroso, permanecendo efetivos por períodos de tempo maiores e são menos reativos com a matéria orgânica, portanto formam menos trihalometanos e são mais estáveis ao armazenamento.

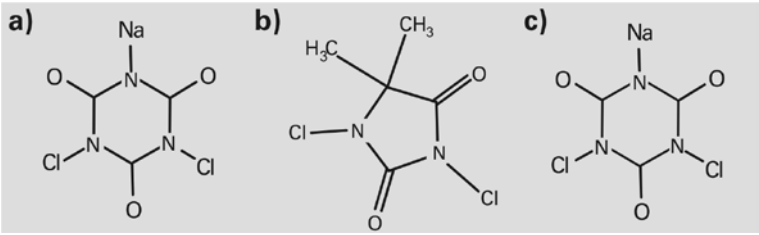


Figura 12 - Sanitizantes clorados orgânicos: a) cloramina T, b) dicloroisocianurato de sódio e c) diclorodimetilhidantoína.

Os compostos clorados são amplamente usados na indústria de alimentos por serem geralmente de baixo custo e efetivo na eliminação de bactérias Gram-positivas e negativas, fungos filamentosos e leveduras. Dependendo do pH da solução, esses compostos sanitizantes apresentam ação sobre esporos bacterianos, grupo microbiano importante em processamento de alimentos. Em soluções com pH mais baixo, em que há maior presença de ácido hipocloroso (HClO), que é a forma não dissociada, a eficiência esporicida do cloro pode ser esperada. Em pH 7,5, por exemplo, 50% do cloro residual livre, como o determinado pelo teste da ortolidina, encontram-se na forma de ácido hipocloroso. Em pH 10 e 5, as concentrações dessa forma não dissociada são de 0,3 % e 99,7 %, respectivamente. Assim, a solução clorada de pH igual a 5 será muito mais esporicida do que aquela de pH igual a 12.

Na indústria de alimentos, os compostos clorados podem ser utilizados para a sanitização de superfícies de paredes, pisos, tetos e equipamentos e utensílios, para a redução do número de microrganismos em carcaças bovinas, suínas e de aves, para a redução do número de microrganismos em frutas e vegetais minimamente processados, para o controle microbiológico de água de resfriamento de alimentos enlatados esterilizados.

A ação antimicrobiana dos compostos clorados, à exceção do dióxido de cloro, está relacionada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma dissociada. Por meio da equação de Henderson-Hasselblach, é possível determinar a concentração do ácido hipocloroso na água. Para isso, é necessário que se conheça a concentração de cloro residual livre e o pH da água. Por exemplo, uma solução contendo 100 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre, com um pH de 7,5, tem 50 $mg.L^{-1}$ de ácido hipocloroso.

Da mesma forma, se o pH da água for 8,5 ou 6,5, as concentrações de ácido hipocloroso serão, respectivamente, 9 $mg.L^{-1}$ e 90 $mg.L^{-1}$, conforme determinado pela reações químicas e fórmula a seguir.

(3)	$Cl_2 + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$HClO + HCl$
(4)	$NaClO + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$HClO + NaOH$
(5)	$=N\text{-}Cl + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$HClO + =N\text{-}H$
(6)	$HClO$	$\rightleftharpoons$	$H^+ + OCl^-$

$$mg.L^{-1}\ de\ HClO = \frac{mg.L^{-1}\ de\ cloro\ residual\ livre}{1 + 10^{pH-7,5}}$$

Iodóforos

Os iodóforos (Figura 13) são compostos derivados do iodo empregados como sanitizantes na indústria de alimentos. São formulações que combinam o iodo e um agente tensoativo, como a polivinilpirrolidona e um agente veiculador ácido. Para manipuladores, normalmente usa-se uma solução-tampão formada pelo ácido acético e pelo acetato de sódio, originando uma solução de uso com pH entre 5 e 6, de modo a não afetar a mão de manipuladores. Já, em equipamentos e utensílios, o ácido utilizado para a veiculação do iodo é geralmente o fosfórico. Nesse caso, as soluções sanitizantes diluídas apresentam um pH em torno de 2, que otimiza a sua ação antimicrobiana, já que há maior concentração de I_2 livre, a forma bactericida. As soluções diluídas de iodóforos são usadas numa concentração entre 10-25 $mg.L^{-1}$, que devem ser controladas.

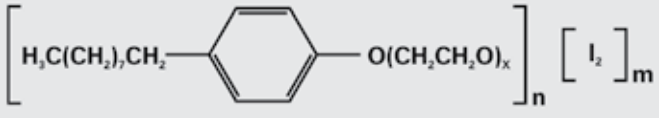


Figura 13 - Estrutura química do complexo iodo-nonilfenoletoxilado.

Por conter tensoativo em sua composição, os iodóforos apresentam boa ação de molhagem, de penetração em fissuras e ranhuras e de espalhamento, além de facilidade de solubilização em água. Além disso, i) não são afetados pela água dura, ii) previnem a formação de incrustações por ser de natureza ácida, iii) sua coloração marrom/castanha é um indicativo de níveis de concentração, iv) sua concentração é facilmente determinada e v) as soluções de rotina são facilmente preparadas. No entanto,

i) esses sanitizantes são menos eficientes do que compostos clorados sobre esporos bacterianos e bacteriófagos, ii) podem causar odores indesejáveis em alguns produtos, iii) causam descoloração em alguns materiais como o plástico, iv) tornam-se menos eficientes com o aumento do pH e v) são mais caros do que o hipoclorito de sódio.

São eficientes sobre variados grupos de microrganismos, com exceção de esporos e bacteriófagos. Esses sanitizantes são utilizados para diminuição da microbiota das mãos de manipuladores de alimentos, sanitização de equipamentos e utensílios e diminuição da microbiota ambiental, quando aplicados na forma de nebulização.

A ação bactericida dos compostos iodados se deve, principalmente, ao I_2 liberado a partir dos complexos com agentes tensoativos. As formulações comerciais encontram-se na faixa de 0,5 % a 1,75 % de iodo residual livre, expresso em I_2. As soluções diluídas de iodóforos são usadas numa concentração entre 10-25 $mg.L^{-1}$. A concentração tanto do produto comercial quanto das soluções diluídas deve ser controlada por meio de análises volumétricas de fácil execução.

Ácido Peracético

O ácido peracético comercial é um sanitizante constituído por uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante (Figura 14). Algumas formulações contêm, ainda, um ácido orgânico como o octanóico. É produzido pela reação de ácido acético com peróxido de hidrogênio na presença de um ácido mineral como catalisador, geralmente o ácido sulfúrico.

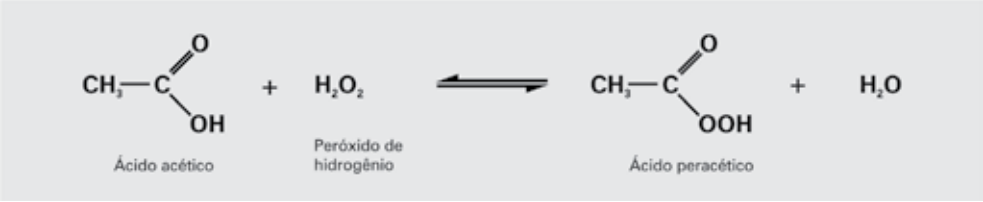


Figura 14 - Formação do ácido peracético.

O ácido peracético é um agente antimicrobiano mais eficiente do que o peróxido de hidrogênio, sendo ativo contra grande espectro de microrganismos. É esporicida em baixas temperaturas e permanece ativo na presença de matéria orgânica. Dentre as vantagens do ácido peracético, verifica-se que são excelentes santizantes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos bacterianos. É corrosivo ao aço inoxidável, mas não há necessidade de ser enxaguados das superfícies, quando as concentrações das soluções de uso são corretamente controladas. É amigável ao meio ambiente, pois os produtos de sua decomposição são o ácido acético e a água. Não são afetados pela dureza da água, mas possuem baixa estabilidade ao armazenamento, são irritantes à pele e às mucosas. São incompatí-

veis com ácidos e alcalinos concentrados e borrachas naturais ou sintéticas. Na forma concentrada, em que é comercializado, deve ser manuseado com precaução pelos manipuladores, que deverão usar equipamentos de proteção individual.

As soluções de ácido peracético têm sido crescentemente empregadas nas etapas de sanitização nas indústrias de alimentos, principalmente laticínios e cervejarias.

Compostos de Amônia Quaternária

São substâncias tensoativos catiônicas que contêm em sua estrutura em átomo de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos alquil ou aril. A fórmula geral das amônias quaternárias está apresentada na Figura 15.

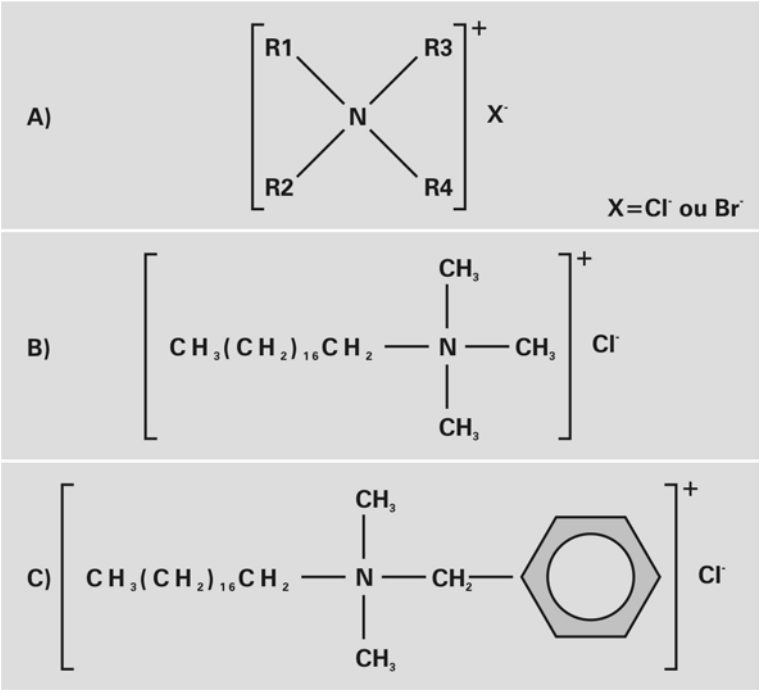


Figura 15 - Quaternários de amônia: a) fórmula geral, b) cloreto de estearalcônio, c) cloreto de benzalcônio.

Esses sanitizantes são eficientes sobre bactérias Gram-positivas e microrganismos termodúricos. No entanto, apresentam baixa ação sobre bactérias Gram-negativas. São pouco eficientes contra coliformes e psicrotróficos e ineficientes contra esporos. São incompatíveis com agentes tensoativos aniônicos. Não são corrosivos nem tóxicos. Geralmente, são utilizados para a sanitização de pisos, paredes e equipamentos e no controle microbiológico do ar de ambientes de processamento.

Clorhexidina

A clorhexidina é um composto químico sintético pertencente à série das bisbiguanida, apresentando fórmula estrutural conforme Figura 16.

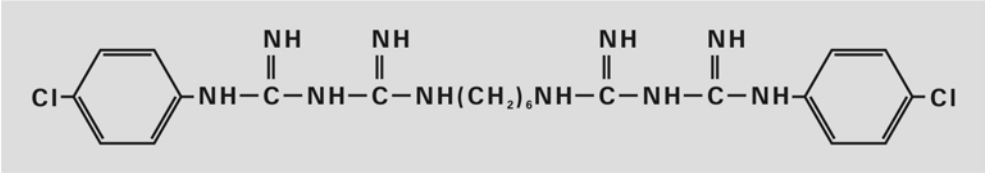


Figura 16 - Estrutura química de clorhexidina.

O digluconato de clorhexidina é a forma deste sanitizante disponibilizada comercialmente em solução aquosa contendo cerca de 20 % p/v do princípio ativo. Na indústria de alimentos, a solução é diluída na proporção de 1:2000 o que corresponde a uma concentração de 100 $mg.L^{-1}$ do princípio ativo e origina um pH entre 5 e 8. Essas soluções são eficientes sobre células vegetativas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os compostos à base de clorhexidina originam soluções aquosas que podem ser inativadas por sais minerais, como os responsáveis pela dureza da água. Como não possuem boa ação de molhagem, podem ser formulados com a participação de tensoativos catiônicos ou não-iônicos. Normalmente, as soluções diluídas desse sanitizante não possuem cor nem odor e parecem apresentar baixa toxicidade em animais. Também, não provocam danos à pele e às mucosas de manipuladores.

Na indústria de alimentos, as soluções diluídas de clorhexidina são usadas para redução da microbiota de manipuladores e para sanitização de equipamentos e utensílios, sendo ainda recomendadas para o controle microbiológico de salmoura no processamento de queijo. A eficiência desse sanitizante foi constatada na diluição 1:3000, que corresponde a cerca de 70 $mg.L^{-1}$ do princípio ativo no tratamento de salmoura e na superfície de queijo minas curado. Verificou-se redução de 96 % na contagem de aeróbios mesófilos e de 70 % na de coliformes totais.

Peróxido de Hidrogênio

As soluções de peróxido de hidrogênio apresentam forte ação oxidante devido à liberação de oxigênio, que possui atividade sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. O peróxido de hidrogênio é uma composto inorgânico que se caracteriza por conter um par de átomos de oxigênio (-O-O-).

Na indústria de alimentos é usado como sanitizante quando se encontra nas concentrações entre 0,3 % e 6 %, pH 4,0, e desde a temperatura ambiente até 80 °C, durante 5 a 20 min de contato. As soluções desse agente sanitizante apresentam baixa toxicidade e não requerem enxaguagem. No entanto, são corrosivas ao cobre, zinco

e bronze; ii) se usadas em baixas temperaturas, requerem longo tempo de contato; iii) exigem precaução no manuseio; e iv) a concentração do princípio ativo deve ser controlada.

O uso principal do peróxido de hidrogênio na indústria de alimentos é na esterilização de embalagens de produtos envasados assepticamente. Nessa última aplicação, as soluções contêm cerca de 30 % do principio ativo, apresentado atividade sobre esporos bacterianos. O peróxido de hidrogênio participa de formulações de sanitizantes à base de ácido peracético.

Comercialmente, encontram-se soluções aquosas de peróxido de hidrogênio contendo cerca de 6 %, 12 % ou 30 % de peróxido de hidrogênio, denominadas 20V, 40V e 100V (volumes), respectivamente.

Ozônio

Descoberto em 1840 pelo químico alemão Christian Schöbein, o ozônio é um alotrópico de oxigênio, naturalmente presente como um gás sem cor e com odor próprio. Ele é produzido na superfície da atmosfera pela ação da radiação ultravioleta nas moléculas de oxigênio.

O ozônio tem sido utilizado na desinfecção de água, ar de ambientes de processamento e, também, no controle microbiológico de alguns alimentos. O uso desse sanitizante é aconselhável, por exemplo, quando a cloração origina subrodutos indesejáveis. A eficiência antimicrobiana do ozônio é dependente da concentração, do tempo de contato, do efeito residual e da temperatura de aplicação. Pode ser usado como agente antimicrobiano de duas formas, no estado gasoso ou dissolvido em água purificada para produzir água ozonizada. A forma gasosa é produzida por diferentes métodos, dependendo da concentração requerida. Concentrações baixas de ozônio (0,03 $mg.L^{-1}$) podem ser obtidas pela exposição do ar à radiação ultravioleta com lâmpadas que emitem 185 nm. Altas concentrações podem ser geradas no local de uso, pela passagem do ar seco ou do oxigênio entre dois eletrodos separados por um meio cerâmico dielétrico. A energia do campo elétrico rompe o O_2, formando o oxigênio atômico que reage com outro O_2, gerando o O_3.

A ação antimicrobiana do ozônio está associada à inativação enzimática pela oxidação de grupos sulfidrilas de aminoácidos componentes de enzimas e pela liberação de constituintes do citoplasma devido à oxidação de lipídeos da membrana celular. O ozônio é um efetivo agente antimicrobiano devido ao seu alto poder oxidante (+2,07 volts), comparado com outros oxidantes como peróxido de hidrogênio (+1,77, ácido hipocloroso (+1,49 volts) e iodo (+0,54) (Quadro 17). É altamente reativo e se decompõe rapidamente, produzindo oxigênio. Portanto, não pode ser estocado e deve ser produzido *in situ*.

Quadro 17 - Características físico-químicas do ozônio

Instabilidade	Meia vida: Fase aquosa <30 min - Fase gasosa: 12 h
Ponto de fusão	-192 ±0,4 °C
Ponto de ebulição	-111,9±0,4 °C
Cor	Azul à temperatura ambiente; incolor em baixas concentrações
Potencial de oxirredução	Ozônio = +2,07V Peróxido de hidrogênio = +1,77V Cloro = +1,49V Iodo = +0,54V
Temperatura de ação	Mais eficiente contra microrganismos às temperaturas mais baixas

Na França, o ozônio é utilizado no tratamento de água potável desde 1906. Após a aprovação pela FDA, em 26 de junho de 2001, o uso de ozônio como agente antimicrobiano para tratamento, estocagem e processamento de alimentos, a aplicação do ozônio expandiu-se para desinfecção de equipamentos, ambientes de produção e redução de células viáveis aderidas em superfícies de aço inoxidável.

O nível de exposição recomendado para aplicação do ozônio em ambientes foi proposto pela Administração de Saúde e Segurança Ocupacional (OSHA), pelo Instituto Nacional Americano de Padrões (ANSI), pela Conferência Americana de Higienistas Governamentais para a Indústria (ACGIH) e pela Associação Americana de Higiene Industrial (AIHA). Os manipuladores não podem ser submetidos ao excesso de ozônio. Na concentração de 0,2 $mg.m^{-3}$, o tempo de exposição do manipulador não pode ultrapassar 8 h por dia de trabalho. Nenhum manipulador de alimentos será exposto à concentração de ozônio que exceda a 0,6 $mg.m^{-3}$, por mais de 10 min. Esses limites recomendados para concentração de ozônio são maiores do que as concentrações que podem ser sentidas pelo olfato. Geralmente, pessoas podem perceber concentração de 0,02 mg de ozônio por m^3.

Várias são as aplicações desse sanitizante na indústria de alimentos. Pode ser utilizado em lavagem de alimentos, tratamentos de água e esgoto, água de poços artesianos e torres de resfriamento, sanitização de vasilhames, sanitização de superfícies de equipamentos e utensílios, sanitização de ar de ambientes de processamento de alimentos, no tratamento CIP (*Clean in Place*) e no tratamento de piscinas comerciais e residenciais.

O ozônio apresenta maior capacidade de oxidação química e maior eficiência antimicrobiana às temperaturas mais baixas e sobre vírus e protozoários, quando comparados a outros sanitizantes químicos de uso comum, embora apresente também excelente ação antimicrobiana sobre bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Quadros 18, 19 e 20).

Quadro 18 - Valores de Q_{10} do ozônio em diferentes temperaturas sobre vírus e protozoários

Microrganismo	Temperatura (°C)	Q_{10}
Poliovirus tipo 1	10-20	1,5
Naegleria gruberi	5-15	2,07
	15	1,58
Giardia muris	5-15	5,17
	15	1,39

Fonte: WICKRAMANAYAK e SPROUL. 1991.

Quadro 19 - Ação do ozônio sobre microrganismos

		% de redução	Tempo de contato (min)	Concentração (mg. L^{-1})	CT*
Bactérias	*Escherichia coli*	99,99	1,67	0,23-0,26	0,38-0,43
	Legionella pneumophila	99,997	20	0,32	6,4
	Salmonela Thyphimurium	99,95	1,67	0,23-0,26	0,38-0,43
Leveduras	*Candida parapsilosis*	99,8	1,67	0,02	0,033
	Candida tropicalis	99,00	0,30	0,02	0,006
Vírus	*Poliovírus tipo 1*	99,7	1,67	0,23-0,26	0,38-0,43
Protozoários	*Naegleria gruberi*	99,00	7,8	0,55	4,29
	Giardia lamblia	99,00	1,2	0,15	0,18

Fonte : WICKRAMANAYAK e SPROUL, 1991.
CT = Concentração x tempo mg x L^{-1} x min

Quadro 20 - Comparação da ação antimicrobiana entre sanitizantes em mg.L^{-1}

Microrganismos	% Redução	Cloro	Dióxido cloro	Ozônio
Cryptosporidium Parvum	99,9	1440	120	5
Giardia lamblia	99,99	122	3-4	0,012-0,4
Escherichia coli	99	-	-	1,25
Polyovirus tipo1	38	6,0	-	-

Fonte : WICKRAMANAYAK e SPROUL. 1991.

Associação entre Ácidos e Tensoativos Aniônicos

Formulações entre ácidos inorgânicos e orgânicos com tensoativos têm sido usadas como sanitizantes. Os ácidos acético, lático, propiônico, fórmico e fosfórico são os que mais freqüentemente participam dessas formulações.

Álcoois

Os álcoois etílico, propílico e isopropílico são usados como sanitizantes na indústria de alimentos. Dentre esses, o álcool etílico apresenta maior aplicação, sendo preferencialmente preparado numa concentração de 70 % do princípio ativo. A essa solução, podem ser adicionados 2 % de iodo e 2 % de glicerina para controle da microbiota de mãos de manipuladores de alimentos.

Na concentração de 70 %, o sanitizante tem ação antimicrobiana mais eficiente, pela desnaturação protéica e remoção de lipídeos da membrana celular dos microrganismos. Em concentrações mais elevadas, por exemplo, 95 % de sua eficiência diminui, pois atua somente por desidratação das células microbianas.

As soluções de alcoólicas são alternativas viáveis para a sanitização de algumas superfícies, em áreas de processamento de alimentos em pó, onde o uso de água deve ser evitado.

Extrato de Semente de *Grape Fruit*

O extrato de semente de "*grape fruit*" é um sanitizante de origem orgânica, sendo um complexo estabilizado fisicamente e integrado por pequenas concentrações de substâncias químicas naturais. Dentre essas substâncias, encontram-se ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido palmítico, glicerídeos, tocoferóis e aminoácidos. Produtos comerciais contendo cerca de 10 % do princípio ativo são disponibilizados às indústrias de alimentos. Soluções diluídas contendo cerca de 400 $mg.L^{-1}$ desse extrato são aplicadas em ambientes de processamento, instalações, equipamentos e utensílios.

Derivados do Fenol

O uso do fenol como agente antimicrobiano data dos meados do século XIX, na desinfecção em procedimentos cirúrgicos. O fenol é uma substância cristalina, incolor, muito solúvel em água, mas de difícil manipulação. Soluções aquosas contendo 2 a 5 % podem ser usadas na desinfecção de equipamentos contaminados. Este sanitizante altera a permeabilidade da membrana celular, permitindo a saída de alguns constituintes celulares essenciais, como os aminoácidos. Alguns compostos fenólicos são excelentes fungicidas, mas apresentam baixa eficiência sobre esporos bacterianos e vírus. Deve-se mencionar o fato, no entanto, que atualmente existem alternativas de sanitizantes mais adequadas à indústria de alimentos.

Vários outros derivados de fenol com uma atividade antimicrobiana mais eficiente foram obtidos por síntese química. Dentre eles incluem-se os cresóis (orto, meta e para), o hesilresorcinol, o hexaclorofeno e o irgasan.

Dentre esses, o hexaclorofeno destacou-se pelo uso na desinfecção de mãos por um extenso período, como participante de formulações de sabões. Em concentrações entre 0,75 % e 3 %, o hexaclorofeno apresenta eficácia, é econômico e não irrita a pele. Pesquisas revelaram, no entanto, que formulações testadas com ou sem este bactericida mostravam pouca diferença na redução de bactérias na superfície de mãos. Foi constatada, ainda, que a redução bacteriana era mais notada após uso contínuo e que o efeito redutor desaparecia quando uma recontaminação intensa ocorria. Posteriormente, a observação sobre a possibilidade de absorção através da pele e de toxicidade do hexaclorofeno, inclusive com possibilidade de ser cancerígeno, resultou na limitação do seu uso.

Irgasan e triclosan são os nomes comerciais de um derivado fenólico normalmente constituinte de formulações detergentes com atividade sanitizante indicado para higienizar mãos de manipuladores de alimentos. Este sanitizante, o 2,4,4'tricloro 2'-hidroxidifenil éter, apresenta um largo espectro de ação antimicrobiana e vasto campo de aplicação. A ação do irgasan/triclosan ocorre em nível de membrana citoplasmática e para assegurar rápida destruição bacteriana o sanitizante tem sido formulado com agentes tenso-ativos apropriados.

Um fato histórico em relação ao fenol merece registro. Este agente químico foi utilizado como antimicrobiano padrão, quando se desenvolveu, no início do século XX, a primeira técnica laboratorial para avaliar a eficiência de sanitizantes. Modificações ocorreram, mas ainda hoje, o princípio desta metodologia, conhecida como teste do coeficiente fenólico, é basicamente a mesma: comparar a ação microbiana de um determinado agente químico contra uma solução padrão de fenol. Não há dúvidas, no entanto, que outras técnicas mais apropriadas para avaliar sanitizantes foram desenvolvidas, mas a determinação do coeficiente fenólico é um método padronizado recomendado pela AOAC (*American of Official Analytical Chemists*) e também usado no Brasil pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) da FIOCRUZ (Fundação Osvaldo Cruz).

3. Avaliação da Eficiência do Procedimento de Higienização

A higienização deve ser avaliada periodicamente de forma a garantir a produção de alimentos seguros, devendo-se adotar medidas corretivas em casos de desvios desses procedimentos. Os resultados dos testes podem ser comparados com as especificações ou as recomendações de órgãos oficiais ou por entidades científicas conceituadas, como a *American Public Health Association* (APHA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Em função dos resultados, mantêm-se as técnicas de higienização adotadas ou são tomadas medidas corretivas.

Quando um procedimento qualquer de higienização, durante o processamento de alimentos, não é eficiente ou é falho, o primeiro indício do problema pode ser o aumento nos números de contaminantes microbianos, o que reforça ainda mais a importância da implantação de um programa de monitoramento pelas indústrias de alimentos. Por isso, a escolha de um método adequado deve estar de acordo com a situação específica, considerando-se o tipo de alimento processado.

Um dos principais fatores que influenciam a escolha do método para a avaliação de superfícies na indústria é o tipo de microrganismo contaminante, em razão das condições de sobrevivência de sua concentração esperada. Além disso, influen-

ciam também a topografia e as condições das superfícies, que envolve a presença de ranhuras e de resíduos de detergentes, de sanitizantes e de alimentos.

Não há uma metodologia universal para a avaliação microbiológica na indústria. Entretanto, pela combinação de metodologias, é possível verificar as condições higiênicas durante o processamento dos alimentos. Como em qualquer análise, o sucesso e a eficiência do método dependem do conhecimento prévio sobre distribuição e adesão bacteriana, sobrevivência e recuperação de microrganismos estressados.

A indústria de alimentos deve propor limites de segurança que deverão ter um sistema de monitoramento, de medição e de registro com freqüência definida para assegurar que o procedimento será efetivo e o que foi estabelecido será alcançado. Dentro dos limites estabelecidos, pode-se considerar que os perigos químicos, físicos e ou microbiológicos serão controlados. Dentre esses controles estão incluídos, por exemplo: i) as concentrações (mg. L^{-1}) dos princípios ativos das soluções sanitizantes; ii) as concentrações dos detergentes; e iii) as recomendações de qualidade microbiológica estabelecida com critério técnico para superfícies higienizadas, ambientes de processamento, manipuladores e de equipamentos.

Como exemplo, especificações para a avaliação microbiológica para manipuladores de equipamentos, utensílios e ar de ambientes de processamento são sugeridas abaixo (Quadro 21).

Quadro 21 - Algumas especificações microbiológicas no proessamento de alimentos

Situação	Especificação microbiológica
Manipuladores	$< 10^4$ UFC. mão^{-1} de mesófilos aeróbios
Manipuladores	$< 10^2$ UFC. mão^{-1} de *Staphylococcus aureus*
Manipuladores	$< 10^1$ UFC. mão^{-1} de *Escherichia coli*
Equipamentos e utensílios	$< 5{,}0x10^1$ UFC. cm^{-2} de mesófilos aeróbios
Ar do ambiente de processamento	$< 1{,}0x10^2$ UFC.cm^{-2}semana^{-1} de mesófilos aeróbios

Os limites críticos devem ser monitorados por técnicas convencionais e, ou, de desenvolvimento recente, desde que sejam recomendadas por entidades oficiais ou por entidades de reconhecida competência como a *Association Official of Analytical Chemists* (AOAC) e *American Public Health Association (*APHA). Normalmente, são os testes em uso que melhor avaliam o procedimento de higienização. Esses testes consistem em remover microrganismos das superfícies de mãos, equipamentos e utensílios. Em seguida, os microrganismos são recuperados em meios de cultura e em condições de incubação apropriadas. No caso do ar de ambientes de processamento, coletam-se os microrganismos usando técnicas de sedimentação ou por aspiração de determinados volumes de ar sobre as superfícies de meios de culturas apropriados.

3.1. Teste do *Swab*

O teste do *swab* é considerado como classe O pela APHA, ou seja, uma metodologia-padrão de análise microbiológica. Desenvolvido em 1917 por Manheimer e Ybanez, é o método mais antigo e utilizado para a avaliação das condições microbiológicas ambientais.

Essa técnica consiste em friccionar um *swab* esterilizado e umedecido em solução diluente apropriada, na superfície a ser avaliada, com o uso de um molde esterilizado que delimita a área amostrada, por exemplo 100 cm^2. Aplica-se o *swab* com pressão constante, em movimentos giratórios, numa inclinação aproximada de 30°, descrevendo movimentos da esquerda para a direita inicialmente e depois de baixo para cima. A parte manuseada da haste do *swab* deve ser quebrada na borda interna do frasco que contém a solução da diluição, antes de se mergulhar o material amostrado com os microrganismos aderidos. O diluente é, então, examinado por plaqueamento de alíquotas em meio de cultura apropriadas, e o resultado é dado por $UFC.cm^{-2}$ de superfície.

Para as mãos de manipuladores, a remoção de microrganismos ocorre numa área correspondente às superfícies das palmas e bordas das mãos, partindo da região dos punhos. De forma angular, o *swab* é passado com movimentos giratórios da parte inferior das palmas até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. Os movimentos nas bordas são do tipo vai e vem, de modo a avançar em um dos lados da mão onde as linhas dos punhos se iniciavam, passando depois entre os dedos, e no final, no outro lado da mão, encontrando-se de novo com as linhas dos punhos.

Os *swabs* podem ser usados em superfícies irregulares e curvas. Devem ter cerca de 12 cm de comprimento de haste, com a parte absorvente (algodão) com aproximadamente 2 cm de comprimento e 0,5-1,0 cm de diâmetro. A facilidade de remoção dos microrganismos da superfície depende da textura desta, de sua natureza e do tipo de microrganismo presente.

Os *swabs* com alginato de cálcio têm a vantagem de liberar os microrganismos para o diluente pela dissolução do alginato. Embora o alginato e componentes dissolvidos no meio de diluição possam inibir o crescimento microbiano, esses *swabs* têm bom desempenho. Nos *swabs* de algodão, os microrganismos podem ficar aderidos as fibras deste e subestimar as contagens.

Em situações onde se deseja verificar a eficiência de procedimentos de higienização e sanitização, agentes neutralizantes específicos devem ser adicionados ao diluente. Para sanitizantes que atuam por oxidação, como cloro, iodo e ácido peracético, recomenda-se como neutralizante solução de tiossulfato de sódio 0,25 %. Para

outros sanitizantes como amônia quaternária e clorhexidina, soluções de lecitina ou tween 80 a 2 % são sugeridas Além disso, na literatura encontram-se recomendações para uso do que se denomina neutralizante universal, cuja composição é capaz de neutralizar qualquer tipo de resíduo de sanitizante usado. Mesmo com limitações, o *swab* é um método rápido, simples e barato de verificação das condições higiênicas ambientais.

3.2. Técnica da Rinsagem

O método de rinsagem consiste em remover os microrganismos das superfícies, usando-se a técnica da lavagem superficial, com certo volume de diluente. Posteriormente, determina-se a população bacteriana da solução de rinsagem, pelo plaqueamento de uma alíquota ou por técnicas de filtração. Geralmente, volumes de 20, 50 e 100 mL são utilizados nessa técnica, dependendo do equipamento ou da superfície a ser avaliada. É uma técnica indicada para superfícies irregulares.

3.3. Placas de Contato

As placas de contato para a análise microbiológica são indicadas para superfícies planas, envolvendo a impressão de um meio de cultura sólido contra a superfície. Para a remoção dos microrganismos, um contato de 5 segundos sob pressão do meio com a superfície a ser avaliada é suficiente para uma boa remoção das células das superfícies. Após a incubação das placas, as unidades formadoras de colônia são contadas, a fim de avaliar as condições microbiológicas da superfície amostrada.

As placas de contato *Replicate Organism Direct Agar Contact* (RODAC) disponíveis comercialmente são preenchidas com uma camada de 15,5 a 16,5 mL de meio de cultura, que ultrapassa a borda da placa de Petri, permitindo o contato facilitado do meio de cultura com a superfície analisada. Com 100 cm^2 de área, essas placas fornecem boa avaliação das condições higiênicas da superfície e são muito utilizadas, pela facilidade e conveniência de uso. É o método de escolha para superfícies úmidas, firmes e não porosas. Foram desenvolvidas por Hall e Hartnett em 1964 e são ineficazes para superfícies muito contaminadas, exceto quando esse problema é minimizado pelo uso de meios seletivos de análise.

Estudos mostram que o método RODAC remove somente cerca de 0,1 % da microbiota da superfície. Isso sugere que 10^1 UFC.cm^{-2} detectados são referentes a uma contaminação real de aproximadamente 10^4 UFC.cm^{-2} .

Quando superfícies de aço inoxidável foram contaminadas por esporos de *Bacillus subtilis*, 41 % dos esporos foram removidos pelas placas RODAC e 47 % pelo método de *swab*. Em outro estudo, *swabs* tiveram melhor desempenho em relação às

placas RODAC, quando a contaminação era superior ou igual a 100 UFC/21-25 cm^2. Mas com contagens menores, as placas de contato mostraram melhores resultados.

Para superfícies curvas ou com ranhuras, as placas Petrifilm ® comercializadas pela empresa 3M podem ser utilizadas para a avaliação por contato direto. Essas placas contêm uma camada de meio de cultura na forma de gel, em um filme flexível, com um indicador para facilitar a enumeração das colônias. Após a hidratação asséptica do gel com 1 mL de solução de diluição esterilizada, a placa pode ser, então, pressionada contra a superfície a ser avaliada, sendo posteriormente incubada de forma usual. Uma vantagem dessa técnica é que o gel pode ser moldado, comprimindo-o contra a superfície curva.

O uso de neutralizantes no meio de cultura utilizado nas placas de contato também se faz necessário quando a eficiência de processos de higienização e sanitização está sendo avaliada.

3.4. Sedimentação de Microrganismos do Ar em Meio Sólido

A técnica da sedimentação simples consiste basicamente em expor uma placa de Petri contendo meio de cultura solidificado por determinado tempo e posterior incubação nas condições apropriadas ao microrganismo que se deseja avaliar. Nesse caso, há a necessidade da deposição das partículas viáveis sobre o meio de cultura. O resultado é expresso em $UFC.cm^{-2}.semana^{-1}$. Para isso, para se expressar o resultado nessa forma, deve-se considerar o tempo de exposição, a área da placa de Petri e o número de colônias contadas após o tempo de incubação. De acordo com recomendação da APHA, o tempo de exposição é de 15 min e a área de placa, de 65 cm^2, pois geralmente o diâmetro das placas de Petri mede 91 mm. Veja o exemplo em que, após a incubação, foram enumeradas 30 colônias. Trinta colônias em 15 min equivalem uma semana: 30x4x24x7. Dividindo esse valor por 65, determina-se o número de microrganismos sedimentados por cm^2 em uma semana.

3.5. Método da Seringa com Agar

Neste método, o meio de cultura apropriado aos microrganismos sob avaliação é adicionado a uma seringa ou um tubo de plástico, onde o meio solidifica-se. Após o contato do meio com a superfície, corta-se com uma espátula esterilizada uma fatia de aproximadamente 1 cm de espessura desse meio, que é coletado numa placa de Petri para a incubação adequada. As vantagens e desvantagens desse método são semelhantes àquelas já mencionadas para as placas RODAC. Normalmente, devem-se amostrar no mínimo cinco impressões, ou seja, coletam-se cinco fatias. O resultado é expresso em $UFC.cm^{-2}$. A área de cada fatia é determinada pela equação: $A = 3{,}1416xr^2$, em que A = área de contato do meio com superfície , r = raio fatia de meio de cultura, em cm.

3.6. Método da Esponja

Este método consiste em usar esponjas de poliuretano, esterilizadas, de dimensões aproximadas de 13x7,5x4 cm, para a remoção dos microrganismos. A coleta dos microrganismos é realizada com o auxílio de uma bolsa esterilizada de plástico com dimensões aproximadas de 30x40 cm. No ato da coleta, a bolsa de plástico será utilizada como uma luva. Assim, a superfície externa da bolsa entra em contato com a pele da pessoa que vai efetuar a coleta. Vestido com a "luva", tira-se uma esponja que será friccionada de forma adequada na superfície que se deseja avaliar. Às vezes, é necessário umedecer a esponja com água peptonada esterilizada, principalmente quando a superfície estiver muito seca. Após a coleta, retira-se a "luva", retornando-a à posição original, com a face esterilizada para dentro e contendo a esponja com os microrganismos removidos da superfície. A partir daí, usa-se o procedimento convencional para as contagens microbianas: os microrganismos são retirados da esponja usando-se soluções diluentes, que serão plaqueadas em meios de cultura, sendo as placas incubadas em condições apropriadas. O resultado é expresso em UFC.cm^{-2}.

3.7. Impressão de Microrganismos do Ar em Meio Sólido

Quando se usa a técnica do amostrador ar, há uma sucção de determinado volume de ar que provoca impressão das partículas viáveis na superfície do meio de cultura solidificado, contido em placa de Petri inserida em local apropriado no mostrador. Os resultados são expressos em UFC.m^{-3}.

Após cada coleta, as placas removidas do amostrador são tampadas, invertidas e incubadas sob condições ideais para cada determinação, sendo 30 °C/3-5 dias para fungos filamentosos e leveduras e 35 °C/48 h para mesófilos aeróbios.

A contagem de colônias é corrigida por meio de uma tabela desenvolvida e baseada no cálculo de probabilidade estatística total, conforme mostrado a seguir:

$$Pr = Nx \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \cdots + \frac{1}{N-r+1} \right]$$

Pr = probabilidade estatística total de UFC;
N = número total de poros da placa de metal (400); e
r = número de unidades formadoras de colônias.

$$UFC.m^{-3} = \frac{Pr}{V}$$

V = volume de ar coletado em m^3.

Essa correção reflete a pressuposição de que quanto maior o número de partículas viáveis impressas na placa, menor a probabilidade de as próximas partículas passarem em orifícios vazios, subestimando a contagem. Dessa forma, o número de UFC por volume de ar em m^3 pode ser determinado (ANDERSEN, 1958).

3.8. Técnica do ATP-Bioluminescência

Também, as condições higiênicas das superfícies para o processamento de alimentos podem ser avaliadas pela quantidade de ATP presente nessas superfícies. Quanto maior a concentração de ATP, pior a condição higiênica das superfícies. Existem comercialmente equipamentos que se fundamentam na técnica do ATP-bioluminescência, que expressam resultados em Unidades Relativas de Luz (URL), que estão relacionadas à quantidade de luz formada entre o ATP presente na superfície e o complexo enzimático luciferina e luciferase (Figura 17). Por exemplo, determinado equipamento informa que superfícies que apresentam até 150 URL encontram-se em condições higiênicas adequadas, de 151 até 300 URL em condições de alerta e acima de 300 URL em condições higiênicas insatisfatórias.

$$\text{Luciferina} + \text{ATP} + O_2 \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Luciferase}} \text{Oxiluciferina} + \text{AMP} + CO_2 + \text{Luz}$$

Figura 17 - Reação enzimática na formação de luz na técnica do ATP-bioluminescência.

Referências

ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 76, p. 471-484, 1958.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimento**s. São Paulo: Editora Varela, 1996. 182 p.

ANTUNES, M. A . **Sistema de apoio à decisão para procedimentos de higiene para Unidade de Alimentação e Nutrição.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2003.

APHA - **Standard methods for the examination of dairy products**. 16th. ed. Washington, D.C.: Richardson, G.H. American Public Health Association,1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 518, de 25 de março de 2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de março de 2004. 2004

BRASIL. Leis e Decretos, etc., Resolução CONAMA no 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientes para seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências**. 2005

CARDOSO, R. C.; CHAVES, J. B. P.;. ANDRADE, N. J.; TEIXIERA, M. A. Avaliação da eficiência de agentes sanficantes para mãos de manipuladores de alimentos em serviços de alimentação. **Higiene Alimentar,** v. 10 p.17-22, 1996

COSTA, P. D. **Avaliação da técnica de ATP-bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. 2001. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

COSTA P. D.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. BRANDÃO, S. C. C. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37 p345-349, 2006

GRAHAM, D. W. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v. 51, p. 72-75, 1997.

GREENBERG, A . E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A . D. ed. **Standard methods examination of water and wastewater**. 18th , APHA, Washington, D.C, 1992.

HAWRONSKYJ, J. M. e HOLAH, J. ATP universal hygiene monitor. **Trends in Food Science and Technology**. v. 8, p. 79-84, 1997.

FIELDING, L., BAILEY R. Ozone decontamination in hygiene management. In: LELIEVELD, H. L. M., MOSTERT, M. A., HOLAH, J. (Ed.) **Handbook of hygiene control in the food industry**. 1st ed., chapter 31, p. 507-515, 2005.

HAYES, P.R. **Food microbiology and hygiene**. 2nd ed. London: [S.l.], 1995. 515p

HEDRICK, T.I.; HELDMAN, D.R. Air quality in fluid and manufactured milk products plants. **Journal of Milk and Food Technology**, Alban, N.Y., v. 32, p. 265-269, 1969.

HELDMAN, D.R.. Significance and Control of Airborne Contamination in Milk and Food Plants. **Journal Milk Food Technology**. 30, p 13-17. 1967

HELDMAN, D.R. Factors influencing air-borne contamination of foods. A review. **Journal of Food Science,** Chicago, I.L., v. 39, p. 962-969, 1974.

KANG, Y.J.; FRANK, F.J. Biological aerosols: a review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. **Journal of Food Protection,** Des Moines, I.A., v. 52, p. 512-524, jul.1989.

KANG, Y.J.; FRANK, F.J. Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants. **Journal of Dairy Science**, Champaing, I.L., v. 73, p 621-626, 1990.

LUTGRING, R.K. et al. Distribution and quantification of bioaerosols in poultry-slaughtering plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p 804-810, 1997.

MACHER, M.J. **Air sampling methods for biological contaminants**. Net. U.S.A., 2000. Disponível em: <http://anderseninstruments.com/Macher.htm>. Acesso em mar./2001.

MARTINS, A. D.O. **Eficiência do ácido peracético sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans***. Viçosa, MG: UFV, 2001.67p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, 2001.

MEHTA, S.K.; MISHRA, S.K.; PIERSON, D.L. Evaluation of three portable samples for monitoring airborne fungi. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, D.C., v. 62, p. 1835-1838, maio 1996.

MERCK, http://www.merck.com.tw/ Microbial Air Monitoring- MAS 100 **Air Sampler-Techinical Information**, p. 1-2. 2001

OTTAVIANI, F. Detection and control of fungal contamination of the air. Experience and methodological proposals. **Tecnologie Alimentari**, Itália, v. 5, p. 16-26, 1982.

OTTAVIANI, F.; FRANCESCHETTI, E. Air-borne moulds in the dairy industry - Review. **Latte**, Milan, v. 7, p. 446-455, 1982.

OVIEDO, M. T. P. **Resistência de psicrotrófico acidificante isolado de leite cru a agentes sanitizantes**, Viçosa, MG: UFV, 1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, 1996.

RADMORE, K.; HOLZAPFEL, W.H.; LUCK, W. Proposed guidelines for maximum acceptable airborne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdamn Netherlands, v. 6, p. 91-95, 1988.

REN, T.J.; FRANK, F.J. A survey of four fluid milk processing plants for airborne contamination using various samplig methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, p 38-42, jan.1992a.

REN, T.J.; FRANK, F.J. Measurement of airborne contamination in two commercial ice cream plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, p 43-47, 1992b.

REN.T.J. e FRANK,F.J., Sampling of Microbial Aerosols at Various Locations in Fluid Milk and Ice Cream Plants. **Journal of Food Protection**, v. 55, p 279-283. 1992.

SALUSTIANO, V.C. **Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento em uma industria de laticínios e seu controle por agentes químicos**. 2002 48p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,MG

RESTAINO, L., FRAMPTON, E. W., HEMPHILL, J. B., PALNIKAR, PAUL. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 61, p. 3471-3475, 1995.

SILVA, R.M.M. **Especificações Microbiológicas para Ambientes, Manipuladores e Equipamentos em restaurantes industriais**. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 69p 1996 (Dissertação de mestrado)

SMILANICK, J. L. **Use of ozone in storage and packing facilities**. Disponível em: <http://postharvest.tfree.wsu.edu/PC2003H>. Acesso em: 01 dez. 2006.

SULLIVAN, J.J. Air microbiology and dairy processing. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett Victoria, v. 34, p. 133-138, 1979.

SUSLOW, T. V. **Basics of ozone applications for postharvest treatment of fresh produce**. Disponível em: <http://www.ozonio.com.br/water_desinfection1891.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2006.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A .; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed., APHA, Washington, DC, 1992, 51-74.

VICKERS, V.T. Control of airborne contamination in dairy processing plants. New. Zealand **Journal of Dairy Science Technology**, v. 21, p. 89-98, 1986.

WICKRAMANAYAKE, G. B.; SPROUL, O. J. Kinects of the inactivation of microorganisms. In: **Block, S. Disinfection, Sterilization and Preservation**, chapter 5; p.72-84, 1991

Capítulo 05

Controle de Doenças de Origem Alimentar no Processamento de Alimentos

1. Introdução

2. Os Fatores do Crescimento Microbiano e o Processamento de Alimentos

- 2.1. Fatores do Crescimento Microbiano
- 2.2. Alguns Aspectos de Processamento *versus* Fatores do Crescimento

3. Avaliação de Surtos de Doenças de Origem Alimentar

- 3.1. Microrganismos Patogênicos
- 3.2. Elucidação de Surtos

4. Conclusão

5. Referências

Nélio José de Andrade
Maria do Socorro Rocha Bastos
Lúcia Helena de Freitas
Patrícia Campos Bernardes

Informações sobre fatores do crescimento microbiano são fundamentas para a definição da melhor maneira de processar um alimento.

1. Introdução

O homem durante sua vida está sujeito a contrair um número elevado de doenças de origem alimentar. Cerca de 250 diferentes doenças podem ser veiculadas ao homem por alimentos contaminados (CDC 2006). Apesar da evolução dos conhecimentos sobre os microrganismos, dos mecanismos de intoxicações e das técnicas de higienização, tem-se observado ainda a ocorrência de um número elevado de surtos e de casos dessas doenças. Isso se deve, principalmente, a eventuais alterações nos métodos de processamento de alimentos que resultam em menor controle microbiológico e a comercialização de grande número de alimentos prontos para o consumo.

Dentre os agentes etiológicos das doenças de origem alimentar que podem contaminar os alimentos desde o campo até a mesa do consumidor, incluem-se as bactérias, os fungos, os agentes químicos, os parasitas, os vírus e as substâncias tóxicas de origens animal e vegetal. Agentes químicos, como metais pesados, parasitas, incluindo *Tricnela spiralis* e *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* spp. e, ainda, vírus, como o da hepatite, são incriminados em alguns surtos de doenças alimentares. No entanto, não há dúvidas de que são as bactérias os principais agentes etiológicos das doenças causadas por alimentos, sendo responsáveis por cerca de 70 % dos surtos e 95 % dos casos (Quadro 1).

Quadro 1 - Etiologia dos surtos e casos de doenças de origem alimentar

Agente etiológico	Surtos (%)	Casos (%)
Bactérias	70	95
Agentes químicos	20	3
Parasitas	7	1
Vírus	3	1

Os principais fatores que contribuem para os surtos de origem alimentar são a temperatura inadequada de armazenagem, tempo e temperatura de cozimento incorretos, equipamentos e utensílios contaminados, matéria-prima de qualidade insatisfatória e más condições higiênicas dos manipuladores (Quadro 2).

Além disso, podem contribuir no aparecimento de surtos de intoxicações alimentares: o preparo de alimentos com muita antecedência ao momento de servir,

sem condições adequadas de armazenagem; a contaminação cruzada, ou seja, alimentos contaminados veiculando microrganismos para outros em boas condições higiênicas; e a adição de ingredientes contaminados a alimentos já cozidos, sem reaquecimento.

Quadro 2 - Principais causas de surtos de doenças de origem alimentar

Causas	% dos surtos
Temperatura inadequada	40
Cozimento incorreto	15
Equipamentos e utensílios contaminados	16
Matéria-prima de qualidade insatisfatória	7
Más condições higiênicas de manipuladores	17
Outros	5

É importante frisar que a maioria desses problemas pode ser controlada. Sem dúvida, a conscientização dos manipuladores, dos processadores, enfim, daqueles que de uma forma ou de outra trabalham com alimentos contribui para evitar ou diminuir os surtos de doenças causadas por alimentos.

Com relação aos locais de produção, sabe-se que cerca de 40 % dos surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorrem em serviços comunitários de alimentação, como serviços de alimentação e nutrição. No entanto, os alimentos industrializados são responsáveis por aproximadamente 5 % dos surtos. No entanto, deve-se observar que a possibilidade de esses alimentos contaminarem grande número de pessoas é maior, considerando-se que podem ser distribuídos em diferentes regiões de um país. Nos último anos, o número de surtos por contaminação de alimentos em cozinhas domésticas tem aumentado consideravelmente, atingindo, às vezes, 50 %.

A postura do profissional da área de alimentos deve ser eminentemente preventiva, no sentido de evitar que os surtos de doenças por alimentos ocorram. Para isso, é fundamental ter e usar conhecimentos de processamento de alimentos, de controle de qualidade, de microbiologia de alimentos e de higienização industrial, entre outros.

No entanto, mesmo tomando-se todas as precauções, existe o risco de que os alimentos venham causar doenças, seja por acidentes, seja por outro motivo. Por isso, o profissional da área de alimentos deve estar preparado para ter condições de avaliar as causas e determinar o agente etiológico responsável pela doença. Deve-se, ainda, saber tomar medidas para evitar que novos surtos aconteçam.

2. Os Fatores do Crescimento Microbiano e o Processamento de Alimentos

2.1. Fatores do Crescimento Microbiano

O conhecimento sobre os fatores que afetam o crescimento microbiano é importante no controle de doenças de origem alimentar. Esses fatores são classificados em intrínsecos e extrínsecos. A atividade de água, o pH, o potencial de oxirredução, a composição dos alimentos e substâncias antimicrobianas naturalmente presentes são fatores intrínsecos, ou seja, inerentes aos alimentos. Já, à temperatura de armazenamento, a umidade relativa, presença e concentrações de gases e a competição entre microrganismos são fatores extrínsecos.

2.1.1. Fatores Intrínsecos

2.1.1.1. Atividade de Água (AA)

A atividade de água é um importante fator do crescimento microbiano. Ela define a quantidade de água disponível ao desenvolvimento dos microrganismos. A atividade de água é a razão entre a pressão de vapor de água no alimento e a pressão de vapor da água pura a 25 °C. Por exemplo, esse fator intrínseco, cujos valores estão entre 0 e 1, determina a possibilidade de desenvolvimento de bactérias patogênicas ou produção de suas toxinas. Assim, *S. aureus* se desenvolve numa atividade de água de 0,86, mas a produção de sua toxina ocorre em valores de 0,90. Dependendo do tipo de *C. botulinum* e em alimentos com pH superior a 4,6, a toxina é produzida em AA de 0,93, enquanto o desenvolvimento do microrganismo já ocorre a 0,90. Outros patógenos, como *Salmonella* spp., *E. coli*, *Shigella* spp., exigem AA acima de 0,95 para se multiplicarem nos alimentos, e atingir níveis que provoquem as doenças. No entanto, sabe-se que, geralmente, as bactérias exigem AA maior do que leveduras. Estas, porém, são mais exigentes do que os fungos (Quadro 3).

De acordo com os valores de AA, os alimentos apresentam a seguinte classificação: i) alimentos com AA acima de 0,86; ii) alimentos com AA entre 0,60 e 0,86; e iii) alimentos com AA abaixo de 0,60.

Os alimentos que apresentam AA acima de 0,86 incluem os leites comerciais, a maioria dos queijos, as frutas, os vegetais, as carnes bovina, suína e de aves, os peixes, pudins e ovos, entre outros.

Esses alimentos permitem o crescimento de todas as formas microbianas. Assim, podem se desenvolver bactérias, leveduras e fungos filamentosos alteradores de alimentos. Também, há condições potenciais para a multiplicação de bactérias patogênicas e fungos filamentosos micotoxigênicos.

Quadro 3 - Atividade de água para crescimento e produção de toxinas de alguns microrganismos

	Microrganismo	Atividade de água	
		Crescimento	Produção de toxina
Bactérias	*Salmonella* spp.	0,95	
	Yersinia enterocolítica	0,95	
	Vibrio parahaemolyticus	0,94	
	Staphylococcus aureus	0,83	0,86
	Bacillus cereus	0,92 - 0,95	
	Clostridium perfringens	0,95	
	Clostridium botulinum	0,90	0,93
	Enterobacter aerogenes	0,94	
	Escherichia coli	0,95	
	Pseudomonas aeruginosa	0,96 - 0,98	
	Bacillus stearothermophilus	0,93	
	Bacillus subtilis	0,90	
	Halobacterium halobium	0,75	
	Alcaligenes sp.	0,95 - 0,98	
Leveduras	*Saccharomyces cerevisiae*	0,90	
	Debaromyces hansenii	0,83	
	Hansenula sp.	0,89 - 0,90	
	Rhodotorula sp.	0,88 - 0,92	
	Saccharomyces rouxii	0,62	
	Zygosaccharomyces bailii	0,82	
Fungos filamentosos	*Aspergiluus niger*	0,77	
	Penicillium citrinum	0,80	
	Alternaria citri	0,84	
	Penicilium chrysogenum	0,79	0,83 - 0,87
	Aspergillus flavus	0,78 - 0,80	0,83 - 0,87
	Aspergillus ochraceus	0,77 - 0,83	0,87 - 0,90
	Penicillium patulum	0,85 - 0,85	0,99
	Penicillium martensii	0,79 - 0,83	
	Trichotecium roseum	0,90	

Os alimentos com AA entre 0,60 e 0,86 também são conhecidos como alimentos com atividade de água intermediária. Nesse grupo de alimentos, estão as carnes curadas, os queijos duros, como o parmesão, o mel, as farinhas lácteas, o doce de leite e o leite condensado, entre outros. Nesses alimentos não há crescimento de bactérias patogênicas, mas eles são passíveis de alterações por bactérias halófilas, leveduras osmofílicas e fungos filamentosos xerófilos. As bactérias halofílicas são capazes de crescer em altas concentrações de sal até valores de AA próximo de 0,75. As leveduras osmofílicas crescem em altas concentrações de açúcar, como no doce de leite ou leite condensado. Já os fungos filamentosos xerófilos são capazes

de se desenvolverem em alimentos com baixos teores de água. Dentre os fungos filamentosos xerófilos alguns são micotoxigênicos. No entanto, para que haja a produção de micotoxinas os valores de AA devem ser superiores a 0,80.

Os cereais, o leite em pó desnatado ou integral, as frutas secas, o café em pó, o açúcar, os biscoitos e vários tipos de condimentos estão dentre os alimentos que apresentam AA abaixo de 0,60. São produtos microbiologicamente estáveis, sem a possibilidade de crescimento microbiano. No entanto, nesses alimentos a sobrevivência das células vegetativas de bactérias e de fungos filamentosos e leveduras é variável, podendo estender-se de dias a meses, ao passo que os esporos bacterianos podem permanecer viáveis durante anos. Por isso, esses produtos podem veicular microrganismos quando são usados como ingredientes de outros alimentos, como o caso do açúcar e condimentos. Também, podem-se tornar perecíveis e veicular patógenos se antes de consumidos forem reidratados e permanecerem em condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, como acontece, por exemplo, com o leite em pó.

2.1.1.2. pH

Os valores de pH dos produtos alimentícios também apresentam grande importância na determinação dos possíveis microrganismos presentes. Em razão desses valores, os alimentos são classificados como "muito ácidos", quando apresentam pH abaixo de 3,7, "ácidos" em valores entre 3,7 e 4,6, de "média acidez" entre 4,6 e 5,3 e, ainda, de "baixa acidez" quando acima de 5,3. Em processamento de alimentos, o pH 4,6 é relevante, pois abaixo desse valor não há desenvolvimento de *Clostridium botulinum.* Além disso, o tipo de processamento para determinado produto é definido levando-se em consideração o pH. Por exemplo, alimentos de baixa acidez e com alta AA recebem o tratamento da esterilização comercial, quando possível.

De forma similar à AA, as bactérias geralmente necessitam de pH mais alto do que as leveduras para se desenvolverem. No entanto, os fungos são os microrganismos que crescem em menores valores de pH (Quadro 4).

2.1.1.3. Potencial de Oxirredução

O potencial de oxirredução (Eh) é um fator intrínseco dos alimentos que associado a outros fatores afeta o desenvolvimento microbiano. Esse fator é medido por eletrodos ou corantes apropriados, e sua unidade é o milivolt (mV). De acordo com a composição do alimento e a atmosfera que o envolve, o potencial redox pode variar de oxidante a redutor. Embora o oxigênio seja de grande importância, o Eh é determinado pelo equilíbrio entre os agentes oxidantes e redutores presentes nos alimentos.

Quadro 4 - Valores de pH para o desenvolvimento de alguns microrganismos

Microrganismos		pH mínimo	pH máximo
Bactérias alteradoras	*Bacillus stearothemophilus*	5,2	9,2
	Bacillus subtilis	4,5	8,5
	Clostridium sporogenes	5,0	9,0
	Pseudomonas aeruginosa	5,6	8,0
	Enterococcus spp.	4,8	10,6
Bactérias patogênicas	*Bacillus cereus*	4,9	9,3
	Salmonella Typhi	4,0 - 4,5	8,0 - 9,6
	Salmonella paratyphi	4,5	7,8
	Escherichia coli	4,4	9,0
	Staphylococcus aureus	4,0	9,8
	Vibrio parahaemoliticus	4,8	11,0
	Clostridium botulinum	4,7	8,5
Leveduras	*Saccharomyces cerevisiae*	2,3	8,6
	Candida pseudotropicalis	2,3	8,8
	Saccharomyces fragilis	2,4	9,0
	Hansenula canadensis	2,1	8,8
Fungos filamentosos	*Aspergillus oryzae*	1,6	9,3
	Penicillium italicum	1,9	9,3
	Aspergilus flavus	1,6	9,0
	Fusarium oxysporum	1,8	11,0

Os microrganismos se desenvolvem em determinadas faixas de potencial redox. Assim, os aeróbios estritos usam o oxigênio como aceptor final de elétrons. Dependendo de diversas condições, as bactérias aeróbias crescem numa faixa que varia de +100 até -100 mV.

Dentre os aeróbios, encontram-se bactérias, fungos alteradores e patogênicos e, ainda, leveduras alteradoras. São exemplos de aeróbios: *Bacillus subtilis* que se desenvolve na superfície de pão, *Pseudomonas fluorescens* que produz limosidades em superfícies de carnes e os diversos fungos micotoxigênicos como *Aspergillus flavus* produtor da aflatoxina em alimentos.

Já os anaeróbios facultativos utilizam o oxigênio e também substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas, por exemplo, nitratos e sulfatos, como aceptores finais de elétrons. Freqüentemente, devido à grande diversidade de metabólitos produzidos, são responsáveis por alterações em produtos de baixo Eh. Além disso, vários microrganismos patogênicos pertencem ao grupo de anaeróbios facultativos. Dentre eles, encontra-se *Staphylococcus aureus* capaz de se desenvolver entre +180 e -230 mV.

Os microrganismos anaeróbios são, no entanto, aqueles que necessitam de potenciais redox mais baixos para seu desenvolvimento. Geralmente, os valores de Eh máximo de crescimento dos anaeróbios varia entre +30 e -250 mV. *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* são patógenos anaeróbios de importância em alimentos. *Clostridium paraputrificum* é um anaeróbico alterador que cresce numa faixa de Eh de -30 a -550 mV. Pesquisas mostram que o efeito inibidor do oxigênio sobre as bactérias anaeróbias está relacionado à sua presença e não à sua influência no potencial redox. O oxigênio provoca o aparecimento de radicais livres, que são altamente tóxicos às bactérias anaeróbias, já que esses microrganismos não possuem a enzima superóxido dismutase, capaz de degradar os radicais tóxicos, tornando-os inócuos aos microrganismos.

Com relação aos alimentos, sabe-se, por exemplo, que as carnes, por conterem compostos químicos com grupos –SH; e as frutas, hortaliças e verduras, ricas em ácidos orgânicos e açúcares apresentam caráter redutor. Outros alimentos vegetais como os sucos, possuem valores de Eh entre +300 e +400 mV, o que favorece a alteração por bactérias aeróbias e fungos filamentosos e leveduras.

2.1.1.4. Composição do Alimento

Outro fator intrínseco do crescimento microbiano que, sem dúvida, influencia os microrganismos presentes é a composição dos alimentos. Assim, carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, sais minerais e diversos outros compostos presentes em pequenas proporções determinam as características particulares de cada alimento, definindo os tipos de microrganismos capazes de se desenvolverem.

Devido a esse fato, os produtos de laticínios, carnes, vegetais, frutas e cereais, entre outros, apresentam microbiota específica, originando problemas bastante diferenciados.

2.1.2. Fatores Extrínsecos

2.1.2.1. Temperatura de Armazenagem

Em função das faixas de temperatura para seu desenvolvimento, as bactérias classificam-se nos seguintes grupos: psicrófilas, psicrotróficas, mesófilas e termófilas (Quadro 5).

Quadro 5 - Temperatura para o Desenvolvimento Bacteriano

Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Psicrófilas	-5 - +5	12 - 15	15 - 20
Psicrotróficas	-5 - +5	25 - 30	30 - 35
Mesófilas	5 - 15	30 - 45	35 - 47
Termófilas	40 - 45	55 - 75	60 - 90

Os termos psicrófilas e psicrotróficas devem ser bem definidos para que não haja controvérsia. As bactérias psicrófilas crescem à temperatura de 0 °C, apresentam ótimo de crescimento em torno ou abaixo de 15 °C e um máximo próximo de 20 °C. São encontrados, geralmente, em ambientes marinhos de regiões muito frias, abrangendo um número relativamente pequeno desses microrganismos. Por isso, e também devido à sua maior sensibilidade a temperaturas mais elevadas, as bactérias psicrófilas são menos importantes, em tecnologia de alimentos, do que as psicrotróficas. Estas últimas são capazes de crescer à temperatura próxima de 0 °C, mas seu desenvolvimento ótimo está em torno de 25 - 30 °C, sendo, inclusive, considerada um subgrupo das mesófilas. As bactérias psicrotróficas são capazes de alterar produtos armazenados sob refrigeração, representando, assim, um grupo de grande importância na indústria de alimentos.

2.1.2.2. Umidade Relativa

A umidade relativa está diretamente relacionada a AA, já que a umidade do alimento entra em equilíbrio com a do ambiente. Em alimentos enlatados, por exemplo, a umidade do alimento está em equilíbrio com a umidade no espaço superior ("head space") da lata. No entanto, um queijo minas frescal, dependendo das condições de armazenamento, vai perder água até atingir o equilíbrio com a umidade que o envolve.

A relação matemática entre a atividade de água e a umidade relativa é a seguinte: AA=UR/100.

2.2. Alguns Aspectos do Processamento de Alimentos *versus* Fatores de Crescimento Microbiano

2.2.1. Esterilização Comercial

O tratamento térmico dos alimentos tem sido amplamente usado e é uma das formas mais seguras para evitar a ocorrência de doenças de origem alimentar por microrganismos patogênicos. Quando o processamento permite, ele é o melhor tratamento aplicado para alimentos de baixa acidez, ou seja, aqueles que apresentam pH acima de 4,6 e AA acima de 0,86. Nesses produtos, o objetivo do tratamento térmico é obter a esterilidade comercial, pois apenas alguns tipos de esporos, que não *C. botulinum*, podem sobreviver. No entanto, esses sobreviventes não apresentam condições de desenvolvimento sob armazenagem à temperatura ambiente, por serem esporos de espécies termófilas, como *Bacillus stearothermophilus*.

Na maioria das vezes, o alvo da esterilização comercial é o controle de *C. botulinum*. Para isso, trabalha-se com binômios tempo e temperatura de processamento em que a possibilidade de contaminação com esse tipo de esporo é uma unidade

contaminada em cada 10^{12} processadas. Nesse caso, nos cálculos dos tratamentos térmicos, parte-se do pressuposto de que os valores $D_{121\,°C}$ das espécies de *C. botulinum* de máxima resistência ao calor situam-se em torno de 0,21 minutos e que o alimento a ser processado apresente um desses esporos por unidade de alimento processado.

Além do rígido controle do binômio tempo temperatura, nesse tipo de preservação do alimento é importante o cuidado para evitar a recontaminação do produto por defeitos na embalagem ou no seu fechamento hermético.

2.2.2. Tecnologias de Barreiras

A preservação de alimentos por barreiras ou métodos combinados consiste na combinação adequada de várias barreiras, para obter alimentos estáveis em suas características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais nas condições de armazenamento, com baixo custo de produção (URBAIN, 1989; CHIRIFE; FAVETO, 1992; ALZAMORA, 1994; LEISTNER; GORRIS, 1995; ROBERTS; HOOVER, 1996; FELOWS, 1997; DAZA, 2000).

As barreiras mais importantes e mais usadas para preservação de alimentos têm sido a alta ou baixa temperatura, atividade de água, acidez, pH, potencial redox, conservantes (nitritos, sorbatos e sulfitos) e competição microbiana, como aquela causada pelas bactérias láticas. No entanto, mais de 60 "barreiras" potenciais para manutenção da qualidade e estabilidade de gêneros alimentícios têm sido descritas.

As barreiras a serem empregadas dependem fundamentalmente do tipo de alimento. No entanto, em qualquer caso, tais barreiras devem ser capazes de manter a microbiota do alimento sob controle. Os microrganismos presentes não devem ser capazes de superar as barreiras presentes, caso contrário ocorrerá a deterioração do produto e até mesmo a veiculação de doenças.

A combinação de pasteurização e pH é uma alternativa para muitos produtos alimentícios em que a esterilização comercial pelo calor é inviável, pois eles perderiam suas propriedades características. Por isso, nesses casos usam-se mais de uma medida de controle na preservação do alimento. Nessa associação de medidas de controle, a temperatura aplicada elimina uma série de microrganismos alteradores e, também, de microrganismos patogênicos, mas não os esporos de *C. botulinum*. Entretanto, a transformação desses esporos em células vegetativas com possível formação de toxina é evitada pelo pH que se apresenta abaixo de 4,6. Produtos com pH abaixo desse valor podem ser obtidos pela adição de ácidos, por processos fermentativos ou, ainda, é característico do alimento. São exemplos desses alimentos os sucos de frutas ácidas pasteurizadas e os picles.

Também, a pasteurização e refrigeração associadas podem ser usadas como barreira ao desenvolvimento microbiano. Nesse caso, como os esporos sobrevivem ao tratamento térmico, a temperatura de armazenagem é responsável pelo controle do desenvolvimento de *C. botulinum*. É importante frisar que, nesse caso, a temperatura de armazenamento ideal deve ser inferior a 3 °C, pois é a temperatura mínima para a produção de toxina por *C. botulinum* do tipo E, que pode contaminar produtos marinhos.

Por exemplo, na pasteurização do leite pelo sistema HTST, geralmente realizada a 72-75 °C por 15 seg, há sobrevivência de microrganismos termodúricos, como espécies dos gêneros *Micrococcu*s e *Streptococcus*, e, ainda, esporos bacterianos. O crescimento desses microrganismos é controlado pelo armazenamento à temperatura em torno de 5 °C. A pasteurização do leite visa à redução de 15 ciclos logaritmos na população de *Coxiella burnetii*, a forma bacteriana vegetativa patogênica mais resistente que contamina esse produto. Se a pasteurização for realizada corretamente e se a contaminação inicial for de uma *C. burnetii* por unidade processada, haverá a probabilidade de uma unidade estar contaminada com a presença do patógeno em 10^{15} unidades processadas.

Uma combinação de pasteurização, sal, nitrito, refrigeração pode também controlar o crescimento de microrganismos em alguns alimentos processados. Nesses alimentos, os esporos sobreviventes não se desenvolvem devido à ação do cloreto de sódio, do nitrito de sódio e do controle da temperatura do alimento já processado. O cloreto de sódio, além de abaixar a AA até níveis que dependem de sua concentração, apresenta, também, poder inibitório sobre os microrganismos através da ação do íon cloreto e da interferência na atividade de enzimas. Já o nitrito de sódio usado geralmente nas concentrações entre 150 e 200 $mg.L^{-1}$, em produtos curados de carne, atua inibindo o crescimento pós-germinativo de esporos e a multiplicação de células vegetativas de *C. botulinum*. Esse procedimento ocorre, por exemplo, em salame e no presunto.

Na aplicação associada da secagem, pH, AA e substâncias antimicrobianas, a preservação do alimento fundamenta-se no controle dos fatores extrínsecos e em propriedades inibitórias do crescimento dos patógenos por substâncias químicas. Usam-se, por exemplo, o cloreto de sódio e o nitrito de sódio. A carne seca é conservada por esse método de preservação.

O tratamento térmico da pasteurização em combinação com o abaixamento do pH, utilizando culturas láticas, e adição de cloreto de sódio é o fundamento do processamento de diversos tipos de queijos. Entretanto, a salga associada à secagem,

originando uma baixa atividade de água, é a forma de se conservar alguns tipos de peixe, como no caso do bacalhau.

2.2.3. Irradiação

A irradiação de alimentos tem sido estudada por mais de 30 anos, em todo o mundo, como uma técnica de processamento para prolongar a vida de prateleira de vários alimentos (LOAHARANU, 1984; LLORENTE FRANCO et al., 1992; DIEHL, 1993; FARKAS, 1998). O processo tem sido relacionado como um método para aumentar a segurança de alimentos, por destruir microrganismos patogênicos, como *E. coli* O157:H7 (MONK et al., 1995; LAANEN, 1999).

A irradiação consiste na exposição dos alimentos à radiação com uma energia de 2 a 5 kGy em comprimento de onda de 2.000 Ă, ou menos. As radiações beta, gama, raios X e as microondas estão incluídas nesse intervalo de comprimento de ondas. Os raios gama são o tipo de irradiação mais usado para processamento de alimentos e é obtido do radioisótopo cobalto^{60}.

Em 1983, o FDA aprovou a irradiação como método de controle de microrganismos em condimentos, principalmente pelo fato de esse tipo de processo ser uma alternativa para alguns aditivos químicos usados em alimentos (MURANO,1995). De acordo com *World Health Organization* (WHO,1997), doses inferiores a 10 KGy não causam alterações substanciais no valor nutritivo dos alimentos e, do ponto de vista toxicológico, não promovem nenhum efeito adverso à saúde humana. No entanto, a qualidade sensorial dos alimentos pode ser alterada para pior em doses de radiação gama mais elevadas.

A irradiação controla, portanto, a contaminação microbiológica de alimentos, porém não pode ser utilizada para devolver a qualidade a alimentos deteriorados. Por isso, a irradiação deve ser associada às boas práticas de fabricação, para a redução da incidência de doenças causadas por alimentos, e cuidados devem ser tomados para que os alimentos irradiados não sejam recontaminados.

2.2.4. Alta pressão hidrostática

A partir da década passada, a tecnologia de alta pressão tem-se expandido na indústria de alimentos. A inativação de microrganismos com alta pressão tem sido reconhecida há muito tempo (SHIGEHISA et al., 1991; STYLES et al., 1991). No entanto, apenas recentemente os pesquisadores se empenharam em estudar o potencial de comercialização da tecnologia de alta pressão na indústria de alimentos.

Os efeitos biológicos da alta pressão são variados e depende de cada microrganismo. A inativação de microrganismos com alta pressão depende do pH, composição, pressão osmótica e temperatura do meio. Pressões moderadas diminuem a velocidade de crescimento microbiano.

Geralmente, as bactérias Gram-positivas são mais resistentes do que as Gram-negativas e fungos filamentosos e leveduras. A inativação de esporos por alta pressão está fortemente influenciada pela temperatura e em menor escala por pH, atividade de água e força iônica. A temperatura ótima para a germinação de esporos difere nas diferentes pressões (BARBOSA; CANOVAS, 1998).

A irradiação provoca a germinação dos esporos e em seguida elimina o esporo germinado, que se comporta como uma célula vegetativa. Pressões entre 300 - 400 MPa inativam os formadores de esporos. Baixas pressões (<100 MPa) induzem a germinação, mas não eliminam todas as células vegetativas de *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp.

A alta pressão hidrostática é um método interessante de conservação de alimentos, principalmente para aqueles que têm características sensoriais, funcionais e nutricionais termossensíveis. Um aspecto importante nessa tecnologia é a possibilidade da manutenção do aroma e textura do alimento, devido à inativação de enzimas ocorrida nesse processamento.

3. Avaliação de Surtos de Doenças de Origem Alimentar

3.1. Microrganismos Patogênicos

As bactérias patogênicas são freqüentemente encontradas em alimentos contaminados. Às vezes, estão em número que podem provocar doenças de gravidade variável em razão do patógeno, mas sempre indesejáveis no sentido de saúde pública. As doenças de origem alimentar são classificadas como intoxicações ou toxinfecções, dependendo de sua etiologia. A intoxicação é causada pela ingestão de toxina pré-formada no alimento. Quando encontram condições favoráveis, algumas bactérias patogênicas se multiplicam no alimento, liberando toxinas que, ao serem ingeridas, provocam a doença. São exemplos de intoxicações as doenças causadas pelas toxinas produzidas por *C. botulinum*, por *S. aureus* e *B. cereus* na sua forma vomitiva.

Nas intoxicações alimentares, os sintomas podem apresentar-se rapidamente, dependendo das quantidades de toxinas ingeridas e da resistência do organismo. À exceção da intoxicação por *C. botulinum*, a duração da doença não é prolongada, ocorrendo a recuperação em torno de 24 h, em média, após o aparecimento dos sintomas. Além disso, na maioria das vezes, nas intoxicações alimentares não ocorre febre, e os sintomas característicos geralmente são dor abdominal, náuseas, vômitos e diarréias. Para intoxicação com a toxina botulínica, a esses sintomas, que

podem aparecer na fase inicial da doença, são acrescidos sintomas neurológicos típicos, como a diplopia, perda de reflexos à luz, disfonia, dificuldade de deglutição e paralisia respiratória.

Epidemiologicamente, nas toxinfecções alimentares pressupõe-se a ingestão de alimentos contendo grande número de células viáveis que podem posteriormente multiplicar no organismo; invadir a parede intestinal; disseminar para outros órgãos ou produzir toxinas no intestino, dependendo do patógeno. São exemplos de toxinfecções alimentares as doenças causadas por *Salmonella, Shigella, Escherichia coli* enteropatogênica, enterotoxigênica ou enterohemorrágica, *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens*, entre outros.

Nas toxinfecções, geralmente os períodos de incubação e duração da doença são maiores do que nas intoxicações. As febres usualmente estão presentes, e quando os microrganismos invadem a mucosa intestinal há ocorrência de fezes com sangue e muco. Em alguns casos pode haver septicemia com as bactérias disseminando para outros órgãos do organismo.

Assim, é importante o conhecimento das principais características dos patógenos responsáveis por doenças de origem alimentar. Dentre eles, destacam-se o *C. jejuni, Campylobacter coli, Salmonella* spp., *E. coli patogênicas, Shigella* spp., *L. monocytogenes, Yersinia enterolitica, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Bacillus cereus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Streptococcus* spp., *vírus Norwalk, hepatite A, hepatite E, rotavírus, Brucella melitensis, Brucella abortus, Brucella suis, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria* e *Pleisiomonas shigelloides.*

3.1.1. Salmoneloses

As espécies do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriacea*e. São Gram-negativas, bastonetes curtos, anaeróbias facultativas e não formam esporos. A temperatura ótima de crescimento é de 38 °C e a mínima, de 5 °C. A faixa de pH para crescimento situa-se entre 4 e 9. Como não formam esporos, são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas pelo tratamento de 60 °C durante 15 a 20 min (ICMSF, 1996).

Salmonella é encontrada nos tratos intestinais de mamíferos, pássaros, anfíbios e répteis. Uma ampla variedade de alimentos contaminados é associada à salmoneloses, incluindo carne bovina crua, aves domésticas, ovos, leite e derivados, peixes,

camarões, temperos para saladas, mistura para bolos, cacau, manteiga de amendoim, cascas de ovos e gemas. A contaminação de alimentos ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação não apropriadas ou contaminações cruzadas de alimentos crus com processados (FORSYTHE, 2002).

Duas síndromes diferentes em humanos são causadas por salmonelas: a febre entérica e a gastroenterite. A primeira síndrome é provocada por *S.* Typhi, responsável pela febre tifo e *S. paratyphi*, causadora de febre paratifo. A doença ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados com fezes e apresentam como os principais sintomas a septicemia, febre alta, dor de cabeça, constipação, vômitos e diarréia. A dose infecciosa varia de acordo com a idade e a saúde da vítima, com o alimento e, ainda, com a estirpe de *Salmonella*. As doses infecciosas podem variar de 20 até 10^6 células.

As gastroenterites são causadas pelas demais espécies de *Salmonella*, que incluem mais de 2.000 estirpes, todas patogênicas ao homem ou animais, sendo cerca de 200 delas isoladas em surtos em humanos (LAMIKANRA, 2002). Estas linhagens diferentes, denominadas sorotipos ou sorovares, são diferenciáveis pelos seus antígenos O, H e Vi, utilizando o esquema de *Kaufmann-White*. As espécies de *Salmonella* possuem estrutura complexa de lipopolissacarídeos composta por lipídeo A, centro e antígeno O (FORSYTHE, 2002). O lipídeo A ancora a molécula na membrana externa e é tóxica, sendo o fator de virulência. A região do centro é composta por molécula de açúcar, e sua seqüência reflete a identidade do organismo. A região O é mais variável: em alguns organismos, a região O pode conter apenas alguns resíduos de açúcar, enquanto em outros pode conter repetidas unidades de açúcar (FORSYTHE, 2002).

De acordo com o CDC (2003), todo ano aproximadamente 40.000 casos de salmoneloses são relatados nos Estados Unidos. Devido à ausência de relatos ou diagnóstico de muitos casos, esse número de infecções pode ser três vezes maior. Crianças, idosos e imunodreprimidos são mais vulneráveis a essas infecções. A estimativa é de que aproximadamente 600 pessoas morram a cada ano com salmonelose aguda.

Em 1999, um surto de salmonelose envolveu 300 pessoas que consumiram cidra de maçã não pasteurizada (CDC, 1999). Produtos frescos podem ser contaminados ainda no campo através de adubo, água contaminada e, ainda, por contato humano (LAMIKANRA, 2002).

Vários surtos de salmoneloses provocados por frutas, principalmente melões cantaloupes, têm sido relatados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos e Canadá. Em 1990, um surto com esses melões foi causado por *Salmonella chester*, que afetou 245 indivíduos, com duas mortes, em 30 estados. O melão era proveniente do México e Guatemala (UKUKU; SAPERS, 2001).

Uma grande incidência de surtos humanos causados pela espécie *S.* Enteritidis nos EUA, Grã-Bretanha e outros países da Europa a partir de 1980 chamou a atenção para fontes comuns da infecção (CDC, 1990, 1991, 1992). As três mais importantes espécies implicadas por surtos em 2002 foram *S.* Typhimurium*, S.* Enteritidis *e S. newport,* com 51% dos isolados (CDC,2002). A *Salmonella Enteritidis* é a espécie responsável pela maioria das *salmoneloses* nos últimos anos, suplantando as espécies *S.agona, S.hadar e S.*Typhimurium.

Num extenso estudo de 115 surtos alimentares por *S.* Enteritidis ocorridos na região de Campinas, no Estado de São Paulo, que engloba 87 municípios, Simões et al. (2001) mostraram que ovos e derivados ou alimentos crus contendo esses ingredientes foram os principais responsáveis pelos surtos. Destacou-se a maionese caseira, com 57% dos casos, seguida pela cobertura de bolos, com 15%. Nesse estudo, 807 pessoas ficaram doentes, ocorrendo cinco óbitos.

O problema da salmonelose em humanos se agrava quando a cepa apresenta resistência às drogas usadas para o seu tratamento. Há consenso em vários países que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal é uma das causas do aumento da resistência antimicrobiana (SILVA; DUARTE, 2002). O uso de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes no ecossistema. Tem sido uma recomendação da Organização Mundial de Saúde o controle e restrição do uso de antimicrobianos na produção animal (WHO, 2001).

A prevenção da salmonelose está baseada em aspectos de higiene, além de evitar o consumo de bebidas ou alimentos que contenham ovos crus e leite não-pasteurizado. Evitar o uso de utensílios que entraram em contato com carnes bovinas ou avícolas cruas. Ter muito cuidado no preparo de alimentos para crianças, idosos e imunodeprimidos. Lavar as mãos após contatos com répteis, pássaros ou fezes de animais de estimação e não trabalhar em áreas de carnes cruas e processadas ao mesmo tempo.

3.1.2. Intoxicação por Enterotoxina Estafilocócica

Staphylococcus aureus é um microrganismo Gram-positivo que se apresenta na forma de cocos em pares, pequenas cadeias ou cachos semelhantes aos de uva. É anaeróbio facultativo e cresce na faixa de 7 °C a 48 °C, mas a produção das enterotoxinas, responsáveis pela doença, ocorre entre 10 °C e 46 °C, sendo essa produção maior entre 40 °C e 45 °C. Em condições ótimas de crescimento do microrganismo, a enterotoxina é detectada em 4 a 5 h. O microrganismo é dividido em diversos biotipos, tendo como base os testes bioquímicos e padrões de resistência (FRANCO; LANDGRAF,1996; FORSYTHE, 2002).

S. aureus é o principal agente responsável pela intoxicação estafilocócica, que ocorre devido à ingestão de alimentos que apresentam toxina pré-formada (FRAN-

CO; LANDGRAF, 1996; OLIVEIRA; HIROOKA, 1999). As enterotoxinas estafilocócicas pertencem a um grupo de nove exoproteínas sorologicamente distintas e classificadas como EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG e EEH (HALPIN DOHNALEK; MARTH, 1989; BERGDOLL, 1996; OLIVEIRA; HIROOKA, 1999).

S. aureus pode ser encontrado no solo, no ar, na água, nos homens e nos animais. No homem, o microrganismo é encontrado principalmente nas fossas nasais, de onde se propaga direta ou indiretamente para pele e feridas. A maioria das cepas de *S. aureus* cresce na faixa de pH de 4,5 a 9, 3, estando o valor de pH mais adequado para a produção da toxina na faixa da neutralidade, entre 6 e 7 (BERGDOLL; BENNETT, 1989). Esse microrganismo possui capacidade de crescer numa atividade de água acima de 0,86, no entanto a produção de enterotoxina é possível a partir de uma atividade de água de 0,90, sendo a ótima 0,99 (BENNETT, 1992).

S. aureus apresenta grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência: estafiloquinases, hialuronidases, fosfatases, coagulases e hemolisinas. As intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas. Uma toxina previamente denominada enterotoxina F é agora reconhecida como responsável pela síndrome de choque tóxico ou por enterite. Essas toxinas são altamente termoestáveis ($D_{98,9} \geq 2$ h) e resistentes à cocção ou a enzimas proteolíticas (FORSYTHE, 2002).

Os alimentos geralmente envolvidos na intoxicação estafilocócica incluem carne de bovinos, suínos e aves e seus derivados e ovos. Também, leite e seus derivados, como os queijos cremosos, bem como outros produtos, como sanduíches, saladas de atum, doces recheados com creme, chocolates e outros, são geralmente incriminados em surtos. Os sintomas aparecem rapidamente após a ingestão, em forma de náuseas, vômitos e dores abdominais.

A toxina estafilocócica é termoestável e muitas vezes não é inativada por pela cocção usual, sendo, então, necessário evitar a contaminação do alimento pelo microrganismo.

3.1.3. Infecção por *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* e que apresenta algumas estirpes patogênicas. Dentre essas, encontram-se *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* invasoras (EIEC) e *E. coli* hemorrágica (EHEC), capazes de causar infecção de origem alimentar. A EPEC provoca diarréia aquosa em crianças, e a ETEC é a causadora da diarréia dos viajantes. A EIEC provoca febre e diarréias profusas, contendo muco e sangue, e a EHEC é responsabilizada por diarréia sanguinolenta, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. Neste último grupo, estão incluídos os sorotipos 0157, 026 e 0111 (FORSYTHE, 2002; CDC, 2003).

E.coli está presente no trato intestinal dos animais e homens e pode ser encontrada como contaminante do solo, água e plantas. As principais fontes no ambiente são as fezes. Dentre as estirpes, as enterohemorrágicas são as mais perigosas, e a dose infecciosa está abaixo 100 células por grama de alimento, sendo que menos de duas células por 25 g já foram responsabilizadas em surtos (IFPA, 2001; LAMIKANRA, 2002). *E. coli* O157:H7 é um representante das estirpes enterohemorrágicas. A maioria das estirpes de *E. coli* se aloja em intestinos humanos e de animais é inofensiva, entretanto *E. coli* O157:H7 produz uma toxina potente e causa doença severa. A cada ano, nos Estados Unidos, essa estirpe enterohemorrágica é responsável por 73.000 casos de infecções e 61 mortes. A infecção geralmente leva à diarréia com sangue e, ocasionalmente, a problemas renais. A maioria das doenças tem sido associada à alimentos mal cozidos e carnes contaminadas. O contato de pessoas para pessoas é também uma forma de transmissão. Frutas e vegetais também podem ser contaminados com *E. coli* O157:H7 no campo ou, ainda, por água contaminada ou pelo pessoal envolvido na colheita. A infecção também pode ocorrer após a ingestão de leite cru e, ou, água contaminada. Devido à existência desses microrganismos nos intestinos de bovinos saudáveis, medidas preventivas em fazendas de gado e durante o processamento de carnes devem ser avaliadas (CDC, 2004).

E. coli O157:H7 difere da maioria das outras linhagens, já que cresce pouco ou não cresce a 44 °C. Esse microrganismo se desenvolve à temperatura de 7 °C - 8 °C e é tolerante a pH ácido. Nos Estados Unidos, quatro surtos de *E. coli* O157:H7 foram epidemiologicamente associados ao consumo de cidra de maçã não pasteurizada (CDC,1997; HEALTH CANADA, 1999). Em agosto de 1993, um surto foi associado com *E. coli* O157:H7, que contaminava melão cantaloupe e melancia.

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, a dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 é desconhecida. No entanto, há relatos na literatura sugerindo que dose infecciosa pode ser tão baixa quanto 10 células (FORSYTHE, 2002).

3.1.4. Campilobacteriose

As espécies do gênero *Campylobacter* são bastonetes, Gram-negativas, de tamanho entre 1,5 - 5 μm. São microrganismos microaerófilos, que requerem de 3 % a 5 % de oxigênio e de 2 % a 10 % de dióxido de carbono e temperatura de 42 - 43 °C. como condições ótimas de crescimento. São sensíveis ao estresse ambiental, sendo afetadas pela presença de oxigênio em concentrações de 21%, pela baixa umidade, pelo calor, pela acidez e pela ação de desinfetantes usuais, dentre outros (FDA, 2001). Essas bactérias são encontradas nos intestinos de pássaros saudáveis e na maioria de carne crua de aves.

A doença pode ser causada pelo consumo de frangos mal cozidos ou outros alimentos que entram em contato com o exsudado da carne crua de frangos (CDC, 2002). Também, é provocada pelo consumo de alimentos crus contaminados pela água ou devido à contaminação cruzada, principalmente entre animais e produtos vegetais. Esse microrganismo também é capaz de crescer em vegetais crus e, ou, minimamente processados, embalados sob condições microaerofílicas (LAMIKANRA, 2002).

A campilobacteriose é uma doença que apresenta como sintomatologia febre, dor abdominal e diarréia, que pode ser profusa, aquosa e, freqüentemente, com sangue. O período de incubação é de 2 a 10 dias e a duração da doença, de cerca de uma semana. O microrganismo é secretado nas fezes durante várias semanas após os sintomas terem cessado. Existem duas espécies principais de *Campylobacter* causadores dessas doenças. A espécie *C. jejuni* causa a maioria dos surtos, envolvendo-se em 89 % a 93 %, seguindo-se a espécie *C. coli* com 7 % a 10 %. Também, as espécies *C. upsaliensis* e *C. iari*, ocasionalmente, são implicadas em surtos alimentares. Tais microrganismos são encontrados em aves domésticas, gado, suínos, ovinos, roedores e pássaros (SKIRROW, 1991).

A dose de *C. jejuni* responsável pela infecção situa-se na faixa de 500 a 10.000 células, dependendo da espécie, danos da célula pelo estresse ambiental e susceptibilidade do hospedeiro (BLACK et al, 1988). As infecções são manifestadas como meningite, pneumonia e a síndrome de Guillain-Barré, caracterizada por paralisia flácida aguda (ALLOS, 1998).

De acordo com a WHO (2004), geralmente não são indicados tratamentos para essas enterites, exceto uma recuperação de eletrólitos e reidratação. Tratamento antimicrobiano, com eritromicina, tetraciclina e quinolonas é indicado em casos invasivos ou para erradicar o microrganismo de portadores.

A prevenção da infecção requer medidas de controle em todos os estágios da cadeia produtiva de alimentos, desde a produção agrícola na fazenda até o processamento e preparação de alimentos em estabelecimentos comerciais ou domésticos. Métodos específicos de intervenção nas granjas de produção têm sido eficientes para reduzir a incidência de *Campylobacter* em aves. As medidas incluem aumento da biossegurança para evitar transmissão direta do ambiente para as aves quando estas são mantidas em locais fechados. Em fazendas de bovinos é mais difícil o controle da contaminação com esses microrganismos, portanto a pasteurização do leite é fundamental. Medidas adequadas de higiene durante o processamento reduzem a contaminação das carcaças por fezes, nas práticas de abate, mas não garante a ausência de *Campylobacter* na carne e produtos derivados. A conscientização do pessoal de abate na produção de carnes cruas para a importância dos bons hábitos

de higiene é essencial para manter a contaminação microbiológica dentro do aceitável. Tratamentos bactericidas, como calor (cozimento ou pasteurização), e irradiação são efetivos na eliminação de *Campylobacter* em alimentos contaminados.

3.1.5. Shigeloses

As espécies de *Shigella* são bactérias altamente contagiosas que colonizam o trato intestinal de homem e de animais. O microrganismo se propaga por contato indireto ou direto com indivíduos infectados. O alimento ou a água podem ser contaminados por material fecal de pessoas infectadas. Esse microrganismo sobrevive por mais tempo quando as temperaturas de manutenção dos alimentos são inferiores a 25 °C e, em menor tempo, em produtos ácidos (ICMSF, 1996).

O gênero *Shigella* é dividido em quatro espécies: *S. dysenteriae, S. sooney, S. flexneri e S.boydii*, sendo todas responsáveis por *shigeloses* em humanos. Essas doenças são geralmente associadas à água e alimentos contaminados com fezes humanas (FORSYTHE, 2002). Assim, produtos frescos podem ser contaminados pela água de irrigação, pelo uso da compostagem como fertilizantes, por insetos e, ainda, pelo contato humano. Frutas e vegetais processados têm sido relacionados com surtos de *shigeloses*. Espécies de *Shigella* podem estar presentes em frutas em porções minimamente processadas, como melancia e mamão, armazenadas sob refrigeração (LAMIKANRA, 2002).

Os principais sintomas da shigelose são diarréias branda ou grave, aquosa ou com sangue, febre, náuseas, vômitos e dores abdominais. Os sintomas aparecem de 12 até 96 h após a exposição a *Shigella* (FORSYTHE, 2002). A *shigelose* pode ser prevenida por lavagem freqüentemente das mãos com detergente apropriado, principalmente após utilizar banheiros. Evitar que pessoas com diarréias preparem alimentos para outros e procurar não engolir água de piscina (CDC, 2003).

3.1.6. Listerioses

*L. monocytogene*s é uma bactéria Gram-positiva, apresentando-se na forma de bastonete, anaeróbia facultativa, não esporulada, psicrotrófica, produz flagelo a 25 °C, mas não a 35 °C. Pode ser encontrada em pelo menos 38 espécies de mamíferos e 17 de vegetais. Esse microrganismo pode contaminar carnes e produtos cárneos, queijos brancos, gelados, frutas e hortaliças, além de alimentos de origem marinha (ICMSF,1996). A dose infecciosa desse microrganismo ainda não está definida. Entretanto, parece ser necessário um número acima 10^3 UFC.g^{-1} para causar a doença. *L. monocytogenes* é amplamente distribuída no ambiente e sobrevive por longos períodos sob condições adversas (IFPA, 2001; LAMIKANRA, 2002). Essa bactéria foi isolada a partir de vários ambientes, incluindo vegetação em decomposição, terra, ração animal, esgoto e água (FORSYTHE, 2002).

L. monocytogenes cresce em baixas concentrações de O_2, como embalagens com atmosfera modificada. Além disso, sobrevive e cresce em faixas variadas de temperatura e pH e, uma vez estabelecida na planta de processamento, é difícil de ser erradicada. A bactéria sobrevive preferencialmente em áreas que são constantemente frias e molhadas, como drenos, tubulações e unidades de refrigeração (ALZAMORA et al., 2000; IFPA, 2001).

Dentre os alimentos identificados com alto risco de veicular a listeriose, incluem-se produtos vegetais refrigerados e minimamente processados (UKUKU; FETT, 2002). *L. monocytogenes* tem sido isolada de saladas mistas de vegetais previamente embalados, como alfaces e pepinos cortados e, ainda, em frutas, como tomates e melão cantaloupe. Também, frutas inteiras e não minimamente processadas têm sido implicadas em surtos de listeriose (LAMIKANRA, 2002).

A listeriose tem sido reconhecida como um problema de saúde pública nos Estados Unidos. Essa doença afeta principalmente mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos com sistema imunológico comprometido. Essa bactéria apresenta trofismo pela placenta, provocando aborto em mulheres. Os principais sintomas da listeriose são: febre, dores musculares e, algumas vezes, sintomas gastrointestinais, como náusea e diarréia. Se a infecção espalha para o sistema nervoso, sintomas como dores de cabeça, tonturas ou convulsões podem ocorrer. Nos Estados Unidos, há uma estimativa de que 2.500 pessoas adoeçam com listeriose a cada ano, ocorrendo óbito de 500 delas (CDC, 2003).

3.1.7. *Yersinioses*

Yersínia enterecolitica é um microrganismo Gram-negativo, na forma de bastonete, com dimensões de 1,0-3,5 μm x 0,5-1,3 μm. É geralmente isolado de pessoas contaminadas com o microrganismo, à partir de feridas, fezes, saliva e nódulos linfáticos mesentéricos. Entretanto, não é parte da microbiota humana normal. Outras espécies do gênero *Yersinia* são responsáveis por doença similar à causada por *Y. enterocolitica*. Por exemplo, *Y. pseudotuberculosis* é capaz de provocar doenças no homem por outras rotas que não seja aquela ingestão de alimentos. Outro exemplo é *Y. pestis*, que pode provocar epidemia. Somente algumas estirpes de *Y. enterocolitica* causam doenças no homem. Tais estirpes são encontradas com maior freqüência em suínos, mas também aparecem em roedores, coelhos, ovelhas, gado, cavalos, cães e gatos. Em suínos, a bactéria é mais facilmente encontrada nas amídalas (CDC, 2004; FDA, 2004).

O crescimento ótimo do microrganismo ocorre na faixa de 30 °C a 37 °C, entretanto também é capaz de crescer à temperatura de refrigeração, como 8 °C.

Os principais sintomas das enfermidades causadas por *Yersinia* são dores abdominais, febre, diarréia (que pode durar várias semanas), inflamação da garganta, fezes com sangue, erupções cutâneas, náuseas, dor de cabeça, mal estar, dores nas articulações e vômitos (FORSYTHE, 2002).

A infecção por *Y. enterocolitica* é geralmente adquirida por consumo de alimento contaminado, especialmente produtos suínos crus ou mal cozidos. A preparação de embutidos crus a partir de intestinos de porco é uma fonte potencial de risco. Leite não pasteurizado e água não tratada podem transmitir esse patógeno ao homem. Ocasionalmente, a yersiniose ocorre após contato com animais infectados. Em raras ocasiões, essa infecção pode ser transmitida, como resultado da bactéria, passando dos resíduos ou dedos sujos de uma pessoa para a boca de outra pessoa. A causa exata da contaminação é desconhecida (CDC, 2004).

As enfermidades causadas por *Yersinia* não ocorrem com freqüência, estando muito associadas à ausência das boas práticas de fabricação na produção de alimentos. A população mais suscetível a doença são as crianças, os debilitados, pessoas idosas e imunocomprometidas (FDA,2004).

3.1.8. Envenenamento Alimentar por *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito e formador de esporos. Esse organismo é agrupado em cinco tipos identificados como A, B, C, D e E, de acordo com as exotoxinas produzidas. Os tipos A, C e D são patogênicos para o homem, enquanto os animais são suscetíveis aos tipos de B, E e, possivelmente, ao tipo A (GERMANO; GERMANO, 2001).

O primeiro relato de seu envolvimento com intoxicação alimentar ocorreu em 1943. É amplamente distribuído no ambiente e freqüentemente é encontrado no intestino de humanos e animais (FORSYTHE, 2002).

A forma mais comum de enfermidade por *C. perfringens* é caracterizada por intensas dor abdominal, náusea e diarréia aguda. O período médio de incubação é de cerca de 12 h, após o consumo de alimentos que contêm grande número de *C. perfringens* na forma vegetativa e produtores de toxina. Os esporos desses microrganismos são resistentes a tratamento térmico e podem, inclusive, ser ativados para se desenvolverem como células vegetativas. A doença normalmente dura 24 h, e sintomas menos severos podem persistir em alguns indivíduos por uma ou duas semanas. Poucas mortes têm sido relatadas e são geralmente resultantes da desidratação ou de outras complicações (FDA, 2004). Na maioria das vezes, a causa primária da doença por *C. perfringens* é a manutenção de alimentos preparados, por exemplo carne cozida, sob temperatura abusiva que favorece a multiplicação celular. As carnes, os produtos cárneos e os molhos são alimentos mais freqüentemente implicados.

As enterites necróticas (*pig-bel*) causadas por *C. perfringens* são quase sempre fatais. Essa doença também inicia com a ingestão de grandes quantidades, acima de 10^8 UFC.g^{-1} de *C. perfringens* do tipo C em alimentos contaminados. As mortes por enterites necróticas são causadas pela infecção e necrose dos intestinos, resultando em septicemia (FORSYTHE, 2002; FDA, 2004).

A prevenção da presença desse microrganismo nos alimentos pode ser obtida pelo controle do binômio tempo temperatura do processo de cocção e pela temperatura adequada de armazenamento.

3.1.9. Botulismo Alimentar

Clostridium botulinum é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos e é o responsável pelos botulismos alimentar, infantil e de ferida. O infantil ocorre quando crianças de até um ano ingerem a forma esporulada do microrganismo. Nesse caso, como a microbiota intestinal da criança não está completamente formada, o esporo de *C. botulinum* é capaz de se multiplicar no intestino e formar a toxina, causando a doença. Já o botulismo de ferida ocorre quando esporos do ambiente contaminam ferimentos no homem, se denvolvem nessas feridas e as toxinas produzidas atingem a corrente sangüínea.

Existem sete tipos de toxinas botulínicas designadas pelas letras de A a G, que são baseadas em diferenças fisiológicas e no tipo de neurotoxina. Somente os tipos A, B, E e F causam doenças em humanos (CDC, 2004).

O botulismo é uma intoxicação alimentar provocada pela ingestão de toxinas produzida por *C. botulinum* e caracterizada por distúrbios digestivos e neurológicos. Essa doença é associada com alimentos enlatados de baixa acidez, principalmente aqueles de produção caseira, vegetais, peixes e produtos de carne. O mel é associado ao botulismo infantil, e, por isso, esse produto deve ser usado com cuidado na alimentação de crianças com menos de um ano de idade (FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2001).

Os sintomas do botulismo são: visão dupla, náusea, vômito, fadiga, tonturas, dor de cabeça, dor de garganta e nariz seco e falhas respiratórias. *C. botulinum* não cresce em condições ácidas (pH<4,6) ou em condições de aerobiose. A maioria das estirpes de *C. botulinum* associada com produtos frescos não cresce ou produz toxinas em temperaturas abaixo de 10 °C. No entanto, deve-se mencionar que *C. botulinum* tipo E, encontrado em produtos marinhos, se desenvolve a 3,3 °C. A produção de toxina por *C. botulinum* normalmente causa alterações sensoriais em produtos frescos. A toxina do tipo A é a mais comum em vegetais (IFPA, 2001). Essa toxina é produzida em faixa de temperatura variando de 10 °C a 50 °C, sendo a faixa ótima de 35 °C a 40 °C e pH de 4,6 a 9,0.

As células vegetativas de todos os tipos de *C. botulinum* são eliminadas rapidamente pelas temperaturas de pasteurização e de cocção dos alimentos. As toxinas botulínicas são extremamente potentes, podendo ocasionar mortes mesmo em quantidades mínimas como 0,1 mg a 1,0 mg. Essas toxinas são termolábeis, e as condições necessárias para sua inativação dependem do tipo de toxina. No entanto, de modo geral, são inativadas a 80 °C por 30 min ou 100 °C por 3 min (GERMANO; GERMANO, 2001). O tratamento térmico de alimentos enlatados de baixa acidez a 121 °C por 3 min ou equivalente eliminará os esporos de *C. botulinum*.

3.1.10. Doenças Alimentares por *Bacillus cereus*

*Bacillus cereu*s é um patógeno alimentar, com morfologia de bastonetes grandes, formadores de esporos não-intumescidos, Gram-positivos, aeróbios facultativos; são móveis, apresentam atividade hemolítica, não produzem cristais de toxina e não apresentam crescimento rizóide. Essas características são usadas para diferenciar *B. cereus* das espécies *B. thuringensis*, *B. cereus var. mycoides* e *B. antrhaci*s.

*B. cereu*s cresce numa faixa 4 °C a 55 °C, sendo de 30 °C a 40 °C o intervalo de temperatura ótima para o seu desenvolvimento, de acordo com a estirpe. O microrganismo cresce bem numa faixa de pH entre 5 e 6, podendo se desenvolver em pH de até 8 (GERMANO; GERMANO, 2001). Esse microrganismo é encontrado por toda a natureza, sendo isolado do solo, da vegetação, da água e dos pêlos dos animais. É comumente encontrado em baixos níveis nos alimentos ($<10^2$ UFC.g^{-1}), considerados aceitáveis. As intoxicações alimentares iniciam quando o alimento é armazenado em temperatura abusiva por longo período, propiciando que um número baixo de microrganismos se multiplique até níveis ($>10^5$ UFC.g^{-1}) capazes de causar a doença (FORSYTHE, 2002).

As doenças provocadas por *B. cereus* se classificam nas formas diarréica e emética. A forma diarréica é causada por uma toxina de natureza protéica de alto peso molecular produzida no intestino humano. Já a emética se manifesta provavelmente devido a um peptídeo termoestável de baixo peso molecular, sendo as toxinas pré-formadas no alimento. Ambas as doenças geralmente têm evolução benigna e a recuperação ocorre em 24 h. Algumas toxinas como enterotoxina diarréica, fator emético, hemolisina I, hemolisina II e fosfatase C têm sido identificadas (FORSYTHE, 2002; FDA, 2004).

A enfermidade tipo diarréica está associada com produtos cárneos, hortaliças, leite e derivados, creme, sopas e molhos, além de purê de batatas e salada de legumes. No entanto, a enfermidade emética está relacionada com produtos amiláceos e

cereais, em especial o arroz. Entretanto, outros alimentos ricos em amido como batatas e massas, além de produtos de queijo, foram implicados em surtos provocados por esse agente etiológico (GERMANO; GERMANO, 2001). Alimentos como ervas e especiarias têm sido relatados como veículos de esporos de *B. cereus*.

Como o microrganismo se encontra por todo o meio ambiente, baixos números ocorrem comumente em alimentos. Por isso, o principal mecanismo de controle é a prevenção da germinação e a multiplicação dos esporos em alimentos cozidos prontos para o consumo. A estocagem de alimentos abaixo de 10 °C inibirá o crescimento de *B. cereus* (FORSYTHE, 2002).

3.1.11. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria encontrada em água salgada e causa gastroenterite nos homens. As espécies patogênicas e não-patogênicas podem ser isoladas de ambientes marinhos, de peixes e de depósitos de carcaças de peixes nesses ambientes (CDC, 2004; FDA, 2004).

Este microrganismo é capaz de crescer em concentrações de 1 % a 8 % de NaCl, apresentando seu crescimento ótimo nas concentrações entre 2 % e 4 %. Sua temperatura máxima de crescimento é de 44 °C, sendo a ótima entre 30 °C e 35 °C (JAY,1994). Os víbrios são bacilos Gram-negativos, pleomórficos, curvos ou retos, móveis, catalase e oxidase positivos, anaeróbios facultativos e são extremamente sensíveis às temperaturas de cocção (GERMANO; GERMANO, 2001).

Os microrganismos estão presentes, normalmente, em quantidade inferior a 10^3 UFC.g^{-1} em peixes e frutos do mar, exceto em águas mornas, onde a contagem pode aumentar para 10^6 UFC.g^{-1}. As infecções causadas por esse microrganismo são associadas ao consumo de peixes e frutos do mar crus, impropriamente cozidos ou cozidos corretamente, mas recontaminados, sendo a ostra um dos maiores riscos. Os sintomas típicos de doença alimentar causada por *V. parahaemolyticu*s são diarréias, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, febre e tremores (FORSYTHE, 2002).

De acordo com CDC (2004), na Ásia, estes microrganismos têm sido uma causa comum de doença alimentar. Nos Estados Unidos, eles são pouco implicados como agentes etiológicos de doença, estimando-se de 30 a 40 casos por ano. O controle dessas infecções pode ser realizado por meio de resfriamento adequado após a pesca e pela cocção completa dos produtos. Também, pode ser controlada, evitando-se a mistura de pescados, oriundos de águas costeiras, nas épocas mais quentes do ano, que apresentam elevadas contagens de *Vibrio* spp. sobretudo *V. parahaemolyticus*, com produtos marinhos capturados em águas mais profundas (CDC, 2004; GERMANO; GERMANO, 2001).

3.1.12. *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus é um microrganismo Gram-negativo, halofílico, Gram-negativo que fermenta lactose. É um patógeno oportunista, sendo encontrado em ambientes marinhos e em águas salobras de lagos. Está associado a vários alimentos de origem marinha, como ostras, moluscos e caranguejos (FDA, 2004).

O microrganismo tem a capacidade de invadir e destruir tecidos, sendo, portanto, associado com infecções que originam feridas e septicemias fatais. Os sintomas típicos da doença alimentar causada por *V. vulnificus* são febre, tremores, náuseas e lesões na pele (FORSYTHE, 2002). A dose infecciosa para os sintomas gastrointestinais em pessoas saudáveis é desconhecida, mas para pessoas predispostas à septicemia pode ocorrer com doses menores que 100 microrganismos (FDA, 2004).

De acordo com CDC (2004), *V. vulnificus* raramente causa doença. Pessoas imunodeprimidas, especialmente aquelas com doenças crônicas no fígado, são as que apresentam maiores riscos quando ingerem produtos marinhos crus, particularmente as ostras. Não existem evidências de transmissão do microrganismo de pessoa para pessoa.

O controle do microrganismo deve ser feito principalmente pela interrupção de coleta de ostras se as temperaturas da água excederem 25 °C e também pelo resfriamento e manutenção das ostras a temperaturas menores que 15 °C (FORSYTHE, 2002).

3.1.13. *Streptococcus* spp.

Streptococcus spp. são cocos Gram-positivos microaerófilos, imóveis e se apresentam em cadeias ou pares. O gênero é definido por meio da combinação de características antigênicas, hemolíticas e fisiológicas nos grupos A, B, C, D, F e G. Os grupos A e D podem ser transmitidos aos humanos via alimentos. Os sintomas de infecções causadas por estreptococos do grupo A são: inflamação e irritação na garganta, dores ao engolir, amidalite, febre alta e dor de cabeça, náusea e vômito, mal-estar e escorrimento do nariz (FORSYTHE, 2002).

Os alimentos em que se pode encontrar *Streptococcus* do grupo A incluem leite, sorvetes, ovos, lagostas ao vapor, presunto, salada de batata, salada de ovos, manjar, pudim de arroz e salada de camarões. A contaminação dos alimentos é o resultado de práticas higiênicas inadequadas, manipulação de alimentos por pessoas doentes ou portadoras assintomáticas, ou uso de leite não pasteurizado. Os alimentos que apresentam contaminação com *Streptococcus* do grupo D incluem salsichas, leite evaporado, queijos, croquetes de carne, torta de carne, leite cru e pasteurizado. A sua entrada na cadeia produtiva é devida ao processamento inadequado e condições higiênicas de preparação de alimentos insatisfatória (FDA, 2004).

Em surtos de doenças alimentares causadas por estreptococos, um grande número de *estreptococos*, hemolíticos ou não, foram isolados de alimentos. Na maioria dos surtos, é implicado *S. faecalis*. No entanto, *S. viridans* também pode ser incriminado (HOBBS; ROBERTS, 1999).

A prevenção e controle de contaminação de alimentos por estreptococos são realizados por meio de cuidados com higiene pessoal e da exclusão de manipuladores com dor de garganta da área de produção.

3.1.14. Doenças Alimentares por Vírus

O vírus *Norwalk* é o representante de patógeno conhecido como *Small Round Structured Viruses*, ou SRSV, que provoca doenças denominadas *calicivíroses*. Esses microrganismos subdividem-se em cinco grupos distintos, quanto à sorologia, e têm sido nomeados de acordo com os locais onde as doenças ocorrem. Quatro grupos são conhecidos como patógenos humanos: o vírus tipo *Norwalk*, com estrutura pequena e redonda, o vírus da hepatite E, o vírus Sapporo e a forma marinha (animal) de calicivírus. O quinto grupo que causa uma doença hemorrágica em coelhos ainda não foi incriminado como patógeno humano (FDA, 2004; FORSYTHE, 2002). O vírus tipo Norwalk foi o primeiro a ser associado com surtos de gastroenterite aguda e foi nomeado com base na localização do surto de *Norwalk* (*Snow Mountain, Hawaii*) (FORSYTHE, 2002).

A doença é caracterizada por náusea, vômito, diarréia e dor abdominal, dor de cabeça, e febre de intensidade média também pode ocorrer. A dose infecciosa é desconhecida, mas presume-se ser baixa. As gastroenterites causadas pelo vírus *Norwalk* são transmitidas por via fecal-oral através da água e dos alimentos contaminados (FDA, 2004). A água pode ser de origem municipal, como de poços, lagos de recreação, piscinas e águas armazenadas em navios de cruzeiro. Em relação aos alimentos, podem-se destacar os moluscos e ostras, principalmente crus, e os ingredientes para saladas. O controle do vírus baseia-se em evitar o contato de alimentos com água contaminada e manipuladores infectados.

O vírus da hepatite A (HAV) é um vírus RNA de fita simples, pertencente ao grupo dos enterovírus da família *Picornaviridae*. A hepatite A, anteriormente denominada hepatite infecciosa, transmite-se pela via fecal-oral (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Seu período de incubação médio é de 30 dias, porém pode variar de 15 a 45 dias. Esse período depende da quantidade de partículas virais ingeridas, diminuindo à medida que aumenta a dose infectante. Os principais sintomas são: fadiga, febre, perda de apetite e náuseas. Na evolução da doença, observam-se dor abdominal e vômitos e, em fase mais adiantada, icterícia e escurecimento da urina (GERMANO; GERMANO, 2001).

O HAV é excretado nas fezes de pessoas infectadas e pode produzir doenças quando indivíduos susceptíveis consomem alimentos ou água contaminados. Presunto e sanduíches, frutas e sucos de frutas, leite e produtos lácteos, vegetais,

saladas, moluscos e bebidas geladas são normalmente implicados em surtos. A contaminação de alimentos por intermédio de manipuladores infectados é comum. O vírus não se multiplica nos alimentos, que são apenas veículos (FORSYTHE, 2002). O vírus da hepatite A tem resistência ao calor elevado, suportando temperaturas de 60 °C por 30 min.

O vírus da hepatite E (HEV) também é um importante agente etiológico de doenças. Trata-se de um vírus esférico com fita simples de RNA, não encapsulado, que possui aproximadamente 32 a 34 nm (FORSYTHE, 2002). O homem tem sido incriminado como hospedeiro natural do vírus da hepatite E, embora haja possibilidade de ser encontrado em outros animais, como os ratos. Essa doença não deve ser confundida com outras hepatites, transmitidas por via parenteral, como a hepatite C ou outras. A transmissão do vírus ocorre principalmente por meio da ingestão de água contaminada, o que o pode determinar a ocorrência de casos isolados ou até mesmo de epidemias.

Os sintomas incluem indisposição, anorexia, dor abdominal e febre. A dose infectante não é conhecida. A taxa de letalidade é similar à da hepatite A (FDA, 2004). De acordo com o CDC (2003), o período de incubação é em média de 40 dias, podendo variar de 15 a 60 dias. Os casos fatais estão na média de 1 % a 3 %, no entanto, em mulheres grávidas atingem entre 15 % a 25 %. Água ou alimentos, principalmente moluscos contaminados por esgoto são os principais veículos do vírus.

O rotavírus pertence à família Reoviridae, tem aproximadamente 70 nm de diâmetro e contém RNA com fita dupla. Seis grupos sorológicos foram identificados, em que três deles (A, B e C) contaminam o homem. As gastroenterites causadas por rotavírus são autolimitantes, variam de brandas a graves e são caracterizadas por vômitos, diarréia aquosa e febre baixa. Presume-se que a dose infecciosa esteja entre 10 e 100 partículas virais (JAY, 1994; FORSYTHE, 2002). Os vírus causam lesões nas células do intestino delgado, principalmente naquelas da parede lateral e do topo das vilosidades. O processo infeccioso instala-se em cerca de 48 h, regredindo após três a cinco dias (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os rotavírus do grupo A são responsáveis por endemias de abrangência mundial. Eles têm sido causa de diarréias severas entre crianças e jovens e responsáveis pela metade dos casos de hospitalização. Mais de três milhões de casos de gastreenterite por rotavírus ocorrem anualmente nos Estados Unidos, mas o número atribuído aos alimentos contaminados é desconhecido. O grupo B que causa uma doença conhecida como diarréia de adulto afeta milhares de pessoas anualmente na China. O grupo C tem sido associado a casos esporádicos de diarréia em crianças, em muitos países. Entretanto, as primeiras enfermidades do grupo C foram relatadas no Japão (FDA, 2004).

A via oral é o principal modo de transmissão. A contaminação pode ser alcançada de pessoa a pessoa e é disseminada por mãos contaminadas. Os manipulado-

res contaminados podem contaminar os alimentos servidos crus, como saladas e frutas (FDA, 2004). O controle do vírus consiste na prevenção da contaminação de alimentos por água poluída ou por manipuladores contaminados.

3.1.15. Outros Microrganismos

Além dos microrganismos patogênicos anteriormente mencionados, deve-se também relacionar outros Gram-negativos de importância na produção de alimentos seguros. Dentre eles, estão *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* e também *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria* e *Pleisiomonas shigelloides*.

As bactérias do gênero *Brucella* provocam a doença denominada brucelose, importante do ponto de vista de saúde pública. *Brucella* é um coco-bacilo Gram-negativo, estritamente aeróbio. Esse microrganismo aloja-se em animais e causa infecções acidentais em humanos. *Brucella melitensis*, causa brucelose em caprinos, *B. abortus* em gado e *B. suis* em suíno (FORSYTHE, 2002). O homem é suscetível à infecção pelas brucelas clássicas: a espécie mais patogênica e invasora para o homem é *Brucella melitensis*, seguindo-se de *B. suis* e *B. abortu*s (GERMANO; GERMANO, 2001).

O homem torna-se contaminado pelo contato com animais ou com produtos de animais que são contaminados com essa bactéria. No homem, a brucelose pode causar sintomas similares aos da gripe, como febre, suor, dor de cabeça e fraqueza. No entanto, infecções severas do sistema nervoso central ou da membrana do coração podem ocorrer. Bruceloses também podem originar sintomas crônicos que incluem febres constantes, dores musculares e fadiga (CDC, 2004).

Os alimentos incriminados como via de transmissão de *B. melitensis* para o homem são os queijos frescos e o leite cru de cabra ou ovelha. Já o leite de vaca cru e os produtos lácteos contaminados por *B. abortus* podem levar a casos esporádicos de brucelose.

A prevenção da brucelose está baseada na erradicação ou no controle do microrganismo nos animais hospedeiros, nas práticas higiênicas corretas e na adequação dos tratamentos térmicos de produtos lácteos e outros alimentos.

O gênero *Aeromonas* pertence a família *Vibrionaceae* e apresenta dois grupos distintos: o primeiro é representado pelas espécies imóveis deste gênero como *A. salmonicida*, um microrganismo psicrotrófico e não patogênico ao homem. O segundo grupo é formado por espécies móveis desse gênero e inclui *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*. As espécies móveis do gênero *Aeromonas* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos. Possuem flagelo polar, geralmente monotríquio, são heterotróficas, produtoras de oxidase e catalase e fermentadoras de carboidratos, com produção de ácido e gás (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Algumas espécies de *A. hydrophila* causam doenças em peixes, em anfíbios e no homem e são encontradas em águas frescas e, ou, salobras. Esses microrganismos têm sido freqüentemente encontrados em peixes, carnes vermelhas e aves. O homem adquire a infecção através de feridas ou por ingestão de água e de alimentos contaminados. Poucas informações são conhecidas sobre o mecanismo de virulência de *A. hydrophila*; então se presume que nem todas as espécies são patogênicas. Estudos com voluntários humanos (dose 10^{11} células) falharam em demonstrar qualquer associação do agente com a doença no homem (FDA, 2004; FORSYTHE, 2002).

Os sintomas gerais de gastroenterites causadas por *A. hydrophila* são: diarréia, dores abdominais, náuseas, tremores e dores de cabeça, colite, podendo ocorrer, ainda, septicemia, meningite, endocardite e úlceras das córneas. As espécies *A. caviae* e *A. sobria* também podem causar enterite em qualquer pessoa ou septicemia em pessoas imunodeprimidas ou debilitadas.

As espécies de *Pleisiomonas* são bastonetes Gram-negativos, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase positivas e fermentadoras de açúcares. Pertencem à família *Vibrionaceae* e apresentam vários antígenos O e alguns H (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Não há certeza de que *P. shigelloides* seja causadora de doença no homem. No entanto, há fortes indícios de sua associação com diarréias em humanos (FDA, 2004).

Esses microrganismos têm sido isolados de água, peixes, frutos do mar e, ainda, de muitos tipos de animais, como bovinos, caprinos, suínos, gatos, cachorros, macacos, abutres, cobras e sapos. Suspeita-se de que nascentes de água sejam a principal origem de possíveis surtos causados por *P. shigelloides.* A ingestão de *P. shigelloides* nem sempre causa doença no animal hospedeiro, que pode se tornar um veiculador temporário do microrganismo.

A dose infecciosa é presumidamente acima de 10^6 UFC.g^{-1}. A patogenicidade da infecção causada por *P. shigelloides* não é conhecida. Os sintomas típicos de gastroenterite causada por esse microrganismo incluem diarréia, dor abdominal, náusea, tremores, febre branda, dores de cabeça e vômitos (FORSYTHE, 2002). O principal método de controle desses microrganismos é a cocção adequada de moluscos antes da ingestão.

3.2. Elucidação de Surtos

Para que a avaliação de surtos de doenças de origem alimentar seja bem-sucedida, as etapas de uma investigação epidemiológica devem ser conhecidas. As informações necessárias à investigação são obtidas aplicando-se questionários envolvendo pessoas e os alimentos relacionados no surto, o comportamento de manipuladores, as condições de processamento (Quadro 6) e um bom conhecimento dos possíveis agentes etiológicos. Além disso, devem ser realizadas avaliações laboratoriais dos alimentos suspeitos e, também, de amostras de sangue, fezes e vômitos de pessoas doentes, quando necessário.

Quadro 6 - Um exemplo de modelo de um questionário para avaliação epidemiológica de surtos

A . Para pessoas doentes e não-doentes envolvidas no surto

1. Nome: _____ Idade: ___/___/___ Sexo: _____

Data: _____

2. Alimentos ingeridos:

A ( ) D ( )
B ( ) E ( )
C ( )

3. Horário da refeição: _____

4. Início dos sintomas: _____

5. Quais sintomas ocorreram?

( ) Febre ( ) Náuseas
( ) Vômitos ( ) Calafrios
( ) Diarréia ( ) Outros
( ) Dores abdominais

6. Em quanto ocorreu a recuperação da doença?

12 ( ) 24 ( ) 36 ( ) 48 ( ) acima de 48 horas ( )

7. ( ) Houve atendimento médico
( ) Houve hospitalização
( ) Foi necessário o uso de medicamentos
Qual (is): _____

B. Para pessoal envolvido no processamento

1. Há manipuladores doentes?

2. Há manipuladores com ferimentos na pele?

3. Há manipuladores com febre ou diarréia?

C . Para o processamento dos alimentos

1. Houve algum fato que alterou a rotina durante o processamento?

2. O processamento recebeu alguma modificação?

3. A temperatura de armazenamento dos alimentos estava correta?

4. O tratamento térmico de processamento (se for o caso) foi controlado?

Dentre os aspectos levantados pela epidemiologia, são importantes a determinação da sintomatologia e do período de incubação, a duração da doença e os alimentos envolvidos.

Em relação à sintomatologia, devem-se considerar aqueles predominantes, que fornecem fortes indícios do tipo de enfermidade envolvida no surto (Quadro 7). Se a ocorrência sintomatológica principal do surto for em vômitos sem febre, a suspeita recai sobre a intoxicação emética, o que remete a *S. aureus,* e a forma vomitiva de *B. cereus*. Esses sintomas devem atingir porcentuais elevados de incidência entre as pessoas doentes envolvidas no surto. Por exemplo, nesse surto, acima de 80% das pessoas devem apresentar vômitos sem febre como principal sintoma.

Quadro 7 - Sintomas predominantes, tipos de doenças e possíveis agentes etiológicos.

Sintomas	Doença	Agente etiológico
Diarréia com ausência de febre	Intoxicação diarréica	*Bacillus cereus* (forma clássica) *Clostridium perfringens*
Diarréia com presença de febre	Infecção diarréica	*Vibrio cholerae* *Salmonela* spp. *Escherichia coli* (enterotoxigênica) *Listeria monocytogenes* *Campylobacter jejuni* *Yersinia enterocolitica*
Diarréia sanguinolenta com pus e febre	Infecção disentérica	*Salmonella typhi* *Salmonella paratyphi* *Shigella* spp. *Escherichia coli* (enteroinvasiva) *Escherichia coli* (enteroemorrágica)
Vômito com ausência de febre	Intoxicação emética	*Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* (forma vomitiva)
Sintomas neurológicos	Botulismo alimentar	*Clostridium botulinum*

Uma sintomatologia caracterizada por diarréia sem febre indica que a doença pode no entanto, ser uma intoxicação diarréica, que por sua vez sugere que o agente etiológico é *B. cereus* em sua forma clássica ou *C. perfringens*. Se a diarréia é aquosa semelhante à água de arroz, coloca-se sob suspeição a cólera e como possível agente etiológico *V. cholerae*. Diarréia sanguinolenta e com muco e pus sugere invasão do tecido celular intestinal, evidenciando-se uma infeccção disentérica. Enquanto febre caracteriza uma infecção, problemas neurológicos estão relacionados ao botulismo alimentar.

Os sintomas complementares são importantes para auxiliar o diagnóstico da doença. Dores musculares e abdominais, mal-estar, calafrios e cefaléia, dentre outros, fazem parte desses sintomas. Além disso, caso não sejam identificados como predominantes, diarréia, vômitos e febre são também considerados complementares.

O período de incubação da doença também auxilia o diagnóstico. Refere-se ao tempo decorrido entre a ingestão do alimento contaminado e a manifestação da

doença. A ocorrência de uma intoxicação emética pode ser diferenciada da diarréica por meio do período de incubação. A toxina causadora da intoxicação emética atua no trato gastrointestinal superior e começa a agir num tempo médio de 2 h, após a ingestão do alimento contaminado. Já aquela que provoca a intoxicação por *C. perfringen*s atua no trato digestório inferior após um período médio de incubação de 12 h. Entretanto, prevê-se que a maioria das infecções tem em média períodos de incubação acima de 24 h.

Quando se dispõe de informações corretamente obtidas pelo levantamento epidemiológico, pode-se determinar o período médio de incubação pela média ponderada obtida dos diversos períodos de incubação e dos respectivos números de casos ocorridos no surto (Quadro 8).

Quadro 8 - Exemplo de cálculo do período médio de incubação

Período de incubação (horas)	Número de casos
0,0 - 0,5	4
0,5 - 1,0	17
1,0 - 1,5	30
1,5 - 2,0	44
2,0 - 2,5	80

$$PMI = \frac{(0{,}5x4 + 1{,}0x17 + 1{,}5x30 + 2\,x44 + 2{,}5x80)}{175} = 2{,}01h$$

PMI = Período Médio de Incubação

A duração da doença corresponde ao período necessário para a recuperação dos pacientes, e pode ser determinada em um levantamento epidemiológico corretamente realizado. Normalmente, as intoxicações emética e diarréica apresentam duração média de 24 h. As infecções normalmente apresentam um tempo de duração maior, podendo-se passar dias ou semanas até que os pacientes se recuperem. É comum a necessidade do auxílio médico com internação hospitalar, a exemplo do que acontece com a febre tifo. Uma doença à parte, em razão de sua gravidade, é a intoxicação botulínica: quando não resulta em morte, pode durar dias a meses, com um prolongado tratamento clínico.

A determinação do alimento suspeito envolvido no surto é importante na definição do tipo de doença, considerando-se a relação entre alimentos e sua microbiota. A incriminação de determinado alimento fundamenta-se nos índices específicos de ataques (IEA) dos diversos alimentos suspeitos. É incriminado o alimento que apresentar o maior índice de ataque positivo.

O IEA consiste na diferença entre as taxas de ataque das pessoas que comeram determinado alimento e ficaram doentes (TCFD) e aquelas que não o comeram e não

ficaram doentes (TNCFD). Obtém-se a TCFD pela divisão do número de pessoas que comeram um alimento específico e ficaram doentes (CFD) pelo número total (T) dos que ingeriram o alimento, multiplicando-se por 100. De forma semelhante, obtém-se a TNCFD dividindo o número de pessoas que não comeram um alimento específico, mas que ficaram doentes (NCFD), multiplicando-se por 100.

Assim, pode-se representar matematicamente IEA, TCFD e TNCFD:

$$IEA = TCFD - TNCFD$$
$$TCFD = (CFD/T)x100$$
$$TNCFD = (NCFD/T)x100$$

A seguir, encontra-se um exemplo hipotético para a definição do alimento suspeito em surto. A partir dos dados epidemiológicos do Quadro 9, foram obtidas as informações contidas no Quadro 10.

Quadro 9 - Dados de um levantamento epidemiológico hipotético

Alimentos	Pessoas que não comeram um alimento específico		Pessoas que comeram um alimento específico	
	Doente	Não-doente	Doente	Não-doente
A	125	119	68	28
B	148	127	44	20
C	190	139	2	8
D	147	98	45	48

Quadro 10 - Taxas e índices de ataques para alimentos específicos

Alimento servido	TCFD	TNCFD	IEA
A	51	71	-20
B	54	69	-15
C	58	20	38
D	60	38	12

TCFD = taxa de ataque das pessoas que comeram o alimento e ficaram doentes.
TNCFD = taxa de ataque das pessoas que não comeram o alimento e ficaram doentes.
IEA = índice específico de ataque.

Verifica-se, assim, que os índices de ataque (Quadro 10) para os alimentos A, B, C e D foram -20, -15, 38 e 12, respectivamente. Portanto, o alimento C é o principal suspeito de provocar a doença, pois apresentou o maior índice de ataque positivo.

Sem dúvida, a avaliação laboratorial dos alimentos suspeitos é imprescindível para elucidar completamente o surto, complementando e confirmando as informações obtidas na avaliação epidemiológica. Sugerem-se dois grupos de análises

microbiológicas para auxiliar o diagnóstico da doença. Um deles é decisivo na elucidação: as análises específicas que estão diretamente relacionadas ao surto. Essas análises se referem principalmente à presença de microrganismo ou toxina nos alimentos suspeitos e, ou, no sangue, vômitos e fezes dos pacientes. Assim, havendo suspeita de ocorrência de intoxicação emética, deve-se avaliar a presença da enterotoxina estafilocócica nos alimentos, nos vômitos e nas fezes. Em caso de botulismo, determina-se a presença da toxina botulínica nas fezes e no sangue. Nas demais doenças, busca-se a presença dos microrganismos nos vômitos, nas fezes e, se for o caso, no sangue dos pacientes.

Outro grupo de análises que pode ser útil na compreensão do surto e que auxilia a sua elucidação refere-se às análises para atendimento da RDC n° 12, da ANVISA/MS, de 02 de janeiro de 2001. De acordo com essa Resolução e dependendo do tipo de alimento, devem-se efetuar uma ou mais das seguintes análises microbiológicas: presença de *Salmonella* spp em 25 g ou mL; estafilococos coagulase positiva; aeróbios mesófilos viáveis; *Bacillus cereus*; *Pseudomonas aeruginosa*; fungos filamentosos e leveduras; coliformes a 35 °C; coliformes a 45 °C; clostrídios sulfito-redutores; *Vibrio parahaemolyticus* e, ainda, o teste de esterilidade, quando for o caso. A denominação "coliformes a 45 °C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes". A presença de clostrídio sulfito redutor a 46 °C indica a ocorrência de *Clostridium perfringens*. A enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. A determinação da capacidade de produção de termonuclease e de toxinas estafilocócicas das cepas isoladas deve ser realizada, a fim de obter dados de interesse à saúde pública. Para conhecer as análises adequadas a um alimento específico, deve-se consultar RDC n°12/2001.

Essas análises de rotina podem reforçar as informações obtidas no levantamento epidemiológico e permitem que no diagnóstico final sejam levados em consideração aspectos da legislação vigente sobre a qualidade dos alimentos envolvidos em determinado surto.

As metodologias para amostragem, colheita, acondicionamento, transporte e análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios devem atender a uma ou mais das seguintes publicações de reconhecimento internacional: *Codex Alimentarius*, *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF); *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* e *Standard Methods for the Examination of Dairy Products da American Public Health Association* (APHA); *Bacteriological Analytical Manual da Food and Drug Administration*, editado pela *Association of Official Analytical Chemists* (FDA/AOAC), em suas últimas edições e, ou, revisões, assim como outras metodologias publicadas por órgãos nacionais ou internacionais reconhecidos.

Quadro 11 - Grupos de alimentos que têm padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC nº12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 2 de janeiro de 2001

1. Frutas, produtos de frutas e similares
2. Hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis)
3. Raízes, tubérculos e similares
4. Outros produtos vegetais
5. Carnes e produtos cárneos
6. Ovos e derivados
7. Pescados e produtos de pesca
8. Leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados
9. Alimentos processados em embalagens herméticas, estáveis à temperatura ambiente, exceção leite e derivados UAT (UHT)
10. Farinhas, massas alimentícias, produtos de panificação (industrializados e embalados) e similares
11. Açúcares, adoçantes e similares
12. Produtos a serem consumidos após a adição de líquido, com emprego de calor (min. 75 °C durante 20 seg), excluindo os de base láctea e de chocolate (cacau e similares)
13. Produtos a serem consumidos após a adição de líquido, sem emprego de calor, excluindo os de base láctea
14. Produtos sólidos prontos para o consumo (petiscos e similares)
15. Especiarias, temperos, condimentos e molhos preparados e similares
16 . Margarina, azeite virgem, gorduras e cremes vegetais e similares
17. Sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não-alcoólicas, excluindo os de base láctea e de chocolate (cacau e similares)
18. Produtos de confeitaria, lanchonete, padarias e similares, doces e salgados prontos para consumo
19. Chocolates, balas, produtos para confeitar, gomas de mascar e similares
20. Alimentos embalados e congelados, exceção de sobremesas
21. Gelados comestíveis e produtos para o preparo de gelados comestíveis
22. Pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares)
23. Leite de coco e coco ralado
24. Produtos à base de soja
25. Alimentos infantis
26. Alimentos para grupos populacionais específicos, incluindo as dietas enterais e excluindo os alimentos infantis
27. Suplementos vitamínico e minerais e similares, em forma de pó, cápsulas, drágeas e similares
28. Aditivos intencionais, coadjuvantes de tecnologia e similares

Por exemplo, caso a avaliação epidemiológica indique a possibilidade de uma intoxicação emética, sendo o principal suspeito um prato à base de carne, haverá mais indícios para confirmar o laudo se a contagem de coliformes fecais, grupo in-

dicador de condições higiênico-sanitárias, estiver elevada, mesmo que não se tenha a análise de *Staphylococcus aureus* ou de *Bacillus cereus*, os principais agentes etiológicos suspeitos. Se o número mais provável (NMP) de coliformes fecais for maior do que 100 por g ou mL, a RDC indica tratar-se de um alimento em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

No caso da aplicação da RDC n°12, é importante que as amostras sejam colhidas dentro de planos de amostragem bem estabelecidos. Para o entendimento correto desses planos, os significados de alguns valores devem ser conhecidos. Por exemplo, o valor "m" é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável. Já "M" é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis. No entanto, n é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos em que o padrão estabelecido é de ausência em 25 g, como em *Salmonella* e *L. monocytogenes*, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo). E, ainda, "c" é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M em planos de três classes. Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

As análises microbiológicas embasam a interpretação dos resultados, que, conforme a RDC n°12, incluem-se em duas categorias: 1) "produtos em condições sanitárias satisfatórias" que se referem àqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual aos estabelecidos para uma amostra indicativa ou uma amostra representativa, e 2) "produtos em condições sanitárias insatisfatórias" que são aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa. Essa interpretação permite a emissão de laudos com as seguintes alternativas: a) "produto ou lote (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) de acordo com os padrões legais vigentes" para as situações enquadradas na categoria 1; b) "produto ou lote (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) impróprio para o consumo humano por apresentar "(citar o(s) resultado(s) analítico(s) e o(s) parâmetro(s) não atendido(s) do anexo i) nas situações na interpretação 2; ou c) "produto ou lote (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) impróprio para o consumo humano por apresentar (microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo à saúde do consumidor).

Veja, como exemplo, as informações contidas no Quadro 12, conforme constam do grupo de alimentos número 15 da RDC, referente às especiarias.

Quadro 12 - Padrões microbiológicos definidos na RDC n°12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2 janeiro de 2001 para especiarias

Especiarias, temperos, condimentos e molhos preparados e similares						
Microrganismos		Tolerância (amostra indicativa)	(amostras representativas)			
			n	c	m	M
a) especiarias íntegras e moídas (grãos, folhas, raízes, ou outras partes do vegetal), isolados ou em mistura, colorífico e similares	Coliformes a 45 °C/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp./25 g	Ausência	5	0	Ausência	-

Nesse caso, significa que uma amostra indicativa pode apresentar um máximo de $5x10^2$ de coliformes 45 °C por grama de especiarias íntegras e moídas para que seja considerado de acordo como os padrões legais vigentes. Quando a amostra for representativa, isso significa que foram coletadas cinco amostras e que, para que o lote seja considerado de acordo com os padrões legais vigentes, no máximo duas delas (c) apresentam contagens entre 10^2 (m) e $5x10^2$ UFC.g^{-1} (M) contagens de coliformes a 45 °C. As contagens desses microrganismos foram inferiores ou iguais a 10^2 UFC.g^{-1}, nas outras três amostras.

Deve-se considerar, para auxílio ao diagnóstico, a disponibilidade de informações sobre análises microscópicas realizadas nos alimentos envolvidos no surto. Embora de execução simples, essas técnicas exigem analistas bem treinados e experientes. É importante na elucidação do surto o conjunto de informações envolvendo morfologia, agrupamento e características tintoriais, como coloração Gram para células vegetativas e verde-malaquita, que permite determinar localização e tamanho de esporos bacterianos (Quadro 13).

Por exemplo, a constatação de bastonetes Gram-positivos e a presença simultânea de esporos centrais não intumescidos em determinado alimento pode auxiliar a incriminação de *Bacillus cereus*. É indício de contaminação com *Staphylococcus aureus* a constatação no alimento suspeito da presença de número elevado de cocos em cacho Gram-positivo. No entanto, se a avaliação epidemiológica fornece subsídios para suspeitar-se de uma salmonelose, deve-se pesquisar na análise microscópica a ocorrência de bastonetes curtos Gram-negativos, não formadores de esporos.

Quadro 13 - Características morfológicas e tintoriais de células vegetativas e de esporos bacterianos

Características		Células vegetativas
Morfologia		Cocos Bastonetes Vibrio
Agrupamento		Isolados Cocos Cadeia Sarcina
Gram		Positivo Negativo
		Esporos bacterianos
Verde-malaquita	Localização	Central Terminal Subterminal
	Tamanho	Intumescido Não-intumescido

Conclusão

A produção de alimentos com qualidades nutritivas e sensoriais e seguros sob os aspectos físico-químicos e microbiológicos envolve conhecimentos sobre fatores do crescimento microbiano associados com o processamento. Além disso, os profissionais da área devem estar preparados para elucidar e diagnosticar possíveis surtos de doenças de origem alimentar e para tomar medida visando à prevenção de novos surtos.

Referências

ALLOS, B.M. *Campylobacter jejuni* infection as a cause of the Guillain –Barré syndrome. **Emerging Infectious Disease.**, v.12, p.173-184. 1998.

ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M.S.; LÓPEZ-MALO, **A. Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications.** An Aspen Publication. Maryland, 2000.360p

ALZAMORA, S.M. Fundamentos del método de conservação por fatores combinados. In: MAUPEY, P. F.; GRAU, A. A. BOIX, A. C. eds. **Aplications de factores combinados en la conservacion de alimentos**: Valencia : Universidade Politécnica de Valencia, Servicio de Publicaciones 1994. p. 1-26.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., POTHAKAMURY, U. R., PALOU, E., SWANSON, B. G. **Conservación no Térmica de los Alimentos**. Zaragoza, Editorial Acribia S.A, 280p. 1998.

BARNHART HM, DREESEN DW, BASTIEN R, PANCORBO O.C. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. **Journal of Food Protection**; v.54, p.488-491. 1991

BENNETT, R.W. Staphylococcal enterotoxins. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**.Ch 34. 3td ed. American Public Association; Washington D.C. 1992.

BERGDOLL, M.S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, v.59, p.559-561, 1996.

BERGDOLL, M.S; BENNETT, R.W. Staphylococcal enterotoxins. In **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. Ch 34. 2nd ed. American Public Association; Washington D.C. p428-457. 1989.

BLACK, R.E., M.M. LEVINE, M.L. CLEMENTS, T.P. HUGHES AND M.J. BLASER.. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **Journal of Infectious Disease**, v. 157, p.472-479,1988.

BRASIL, 1995. Ministério da Agricultura - Portaria SDA. N.126, de 06 novembro 1995. Diário Oficial da União, Brasília, DF. MAA. [**Normas para diagnóstico das Salmoneloses aviárias**,. 1995

CDC- Center for Diseases Control and Prevention. **Multistate Outbreaks of Salmonella Serotype Poona Infections Associated with Eating Cantaloupe from México- United States and Canada**, 2000-2002. v. 51, p.1044-1047. 2002.

CDC- Center for Diseases Control and Prevention. **Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Foodborne Illnesses-Selected Sites**, United States, v.51, p.325-329. 2002.

CDC- Center for Diseases Control. **Disease Information**. ***Botulism***. 2004. Disponível em http:\\www.cdc.gov. Acesso em julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **Disease Information**. ***Brucellosis***. 2003. http:\\www.cdc.gov. Acesso em julho de 2004.

CDC- Center or Diseases Control. Disease Information. *Escherichia coli* O157:H7. 2004. Disponível em http:\\ www.cdc.gov. Acesso em Julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **Disease Information**. ***Hepatitis* E**. 2003. Disponível em http:\\www.cdc.gov. Acesso em julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **Disease Information**. ***Listeriosis***. 2003. Disponível em http:\\ www.cdc.gov. Acesso em Julho de 2004

CDC- Center for Diseases **Control. Disease Information. *Shigellosis***. 2003. Disponivel em http:\\www.cdc.gov. Acesso em Julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **Disease Information**. ***Vibrio parahaemolyticus***. 2004. Disponível em http:\\www.cdc.gov. Acesso em julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **Disease Information. *Yersinia enterocolitica***. 2004. Disponível em http:\\www.cdc.gov. Acesso em julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **Outbreak of Salmonella enteritidis associated with consumption of rAA shell eggs**; 1991. MMWR 1992. Disponível em http:\\www.cdc.gov. Acesso em Julho de 2004.

CDC- Center for Diseases Control. **SE outbreaks reported**; 1992. MMWR 1993. Disponível em http:\\www.cdc.gov. Acesso em julho de 2004.

CDC- Center for Diseases **Control. Update**: **Salmonella enteritidis infections and shell eggs** - United States, 1990. MMWR 1990; 39: 902-912 / 41: 369-372.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. **Disease Information. Salmonellosis.** reviewed in 2003. Disponível em http://www.cdc.org. Acesso em julho de 2004.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em http://www.cdc.org./ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections.htm Acesso em novembro de 2006.

CENEPI - FUNASA - MS. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**, 2001.

CHIRIFE, J.; FAVETTO, G.J. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. **Food Research International**, v.25, p. 389-396, 1992.

D'AOUST, J.-Y. *Salmonella* and the International Food Trade. **International Journal of Food Microbiology,** v.24, p.11-31, 1994.

DAZA, M. S. T.; ALZAMORA, S.M.; WELTI-CHANES, J. **Minimally processed high-moisture fruit products by combined methods. Results of a multinational project**. In : FITO, P.; ORTEGA-RODRIGUEZ, E.; BARBOSA-CANOVAS,G.V (Ed). Food Engineering, New York: Chapman & Hall, 1997. Cap. 10, p.161-180., 2000.

DIEHL, J.F. Will irradiation enhance or reduce food safety?. **Food Policy**, v. 18 p.143-151.1993.

EBEL ED, DAVID MJ, MASON J. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in the US commercial egg industry. Report on a national spent hen survey. **Avian Diseases** 1992; 36: 646-654.

FARKAS, J. **Irradiation of Dry Food Ingredients**, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988.

FELLOWS, P. **Food processing technology, principles and practice**. Ed. Woodwead Pub. Limited, Cambridge, England. p. 186-194. 1997.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A**, 1998 Chapter 7. March 2001. Disponível em http:\\www.fda.org. Acesso em junho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. ***Yersinia enterocolitica.*** 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em Julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic **Microorganisms and Natural Toxins Handbook.** Cl. perfringens. 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em Julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. ***Bacillus cereus*** **and other Bacillus**. 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Vibrio parahaemolyticus.*** 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em Julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. ***Vibrio vulnificus.*** 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic **Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. ***Yersinia enterocolitica*****.** 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. ***Streptococcus spp.*** 2004. Disponível em http:\\ www.fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Norwalk Vírus**. 2004. Disponível em http:\\www. fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.Hepatitis E**. 2004. Disponível em http:\\www.fda. gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Rotavírus**. 2004. Disponível em http:\\www.fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Aeromonas hydrophila**. 2004. Disponível em http:\\ www.fda.gov. Acesso em julho de 2004.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. **Plesiomonas**. 2004. Disponível em http:\\www.fda. gov. Acesso em julho de 2004.

FORSYTHE, S., J. Microbiologia da segurança alimentar. ARTMED, Porto Alegre - RS, 2002.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. 182 p.

GERMANO, M. P. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela. 2001. 629 p.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods, a review. **Journal of Food Protection,** v.52, n.4, p.267-268, 1989.

HEALTH CANADA. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurized on-commercial, custom-pressed apple cider- Ontário 1998. **Disease Report**., v.25, 7 pp. 1999.

HOBBS, B.C; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico- Sanitário de Alimentos**. Ed. Varela, 1999. 376p.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microrganisms in Foods 6. **Microbial Ecology of Food Commodities**. First edition. 1998. Blackie Academic and Professional. 615 p.

IFPA- International Fresh-cut Produce Association. **Food Safety Guidelines for the Fresh-cut Produce Industry**. 4th, 2001. 213p.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de Los Alimientos**. Terceira Edicion. Editorial ACRIBIA. S. A. Zaragoza. 1994. 804 p.

LAANENM P. V. **Understanding food irradiation** (http://ifse.tamu.edu/ifse/irradiationart.html), 1999.

LAMIKANRA, O.; **Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology and Market**. CRC Press, Washington, D.C. 2002.

LEISTNER, L., GORRIS, L. G. M. food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science and Technology**. v. 6, p.41-46, 1995.

LLORENTE FRANCO,S.,GIMENEZ, J.L., MARTINEZ SANCHEZ,F., AND ROMOJARO, F. Effectiveness of ethylene oxide and gamma irradiation on the microbiological population of three types of paprika. **Journal of Food Science** v.51, p.1571-1572,1574,1992.

LOAHARANU, P. Status and prospects of food irradiation. **Food Technology**. v.48, p124:131,1994.

MONK, J. D, BEUCHAT, L.R; Doyle, M. P. Irradiation inactivation of foodborne microorganisms. **Journal of Food Protection**. v.58, p.197-208,1995.

MURANO, E.A. Irratiation of Fresh Meats. **Food Technology**. v.49, p.52-52, 1995

OLIVEIRA, T.C. R. M; HIROOKA, E.Y. Low cost production and purification of polyclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A. **Ver. Microbiolo.**, v.30, p.120-124, 1999.

ROBERTS, C. M.; HOOVER, D. G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of hygh hydrostatic, pressure, heat, acidity and nisin. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.363-368,1996.

SHIGEHISA, T.; OHMORIT.; SAITO,A ; TAJI, S AND HAYASHI, R. Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat products. **International Food Microbiology** v.12, p. 207-216,1991.

SILVA, E.N; DUARTE, A. *Salmonella Enteritidis* em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** V.4, n.2, 2002.

SIMÕES M., MARQUES E.G. L., ROCHA M. M. M, PRANDI, M. A. G., PISANI B. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. In: **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**; 2001; Foz do Iguaçu, Paraná. Brasil. p.413.

SKIRROW, M.B. Epidemiology of *Campylobacter enteritis.* **International Journal. Food Microbiology**, 12, 9-16. 1991.

SNOEYENBOS GH, SMYSER CF, VAN ROEKEL H. *Salmonella* infections of the ovary and peritoneum of chickens. **Avian Diseases**; v.13, p.668-670. 1969

STYLES, M.F.; HOOVER, D.G and FARKAS, D.F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. **Journal of Food Science**, v.56, p.1404-1407, 1991.

THAYER, D.W. Wholesomeness of Irradiated Foods. **Food Techonogy**, v. 48, p.132-137, 1994.

TOLEDO, A. G.; VIANNA, M. S. R. **Boletim de Divulgação Técnica e Científica. Centro de Estudos. Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária. Secretaria Municipal de Saúde.** Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro., n. 12, 2002.

UKUKU, D.O.; FETT, W. Behavior of *Listeria monocytogenes* Inoculated n Cantaloupe Surfaces and Efficacy of Washing Treatments to Reduce Transfer from Rind to Fresh-Cut Pieces. **Journal of Food Protection**. v.65, p.924-930. 2002.

UKUKU, D.O.; SAPERS, G.M. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella stanlety* attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh - cut tissues during cutting practices. **Journal of Food Protection**. v.64,. p.1286-1291. 2001.

URBAIN, W.M. Food Irradiation: the past fifty years as prologue to tomorrow. **Food Technology** v. 43, p.76,92, 1989.

WALTMAN, WD, HORNE AM, PIRKLE C, JOHNSON D.C. Prevalence of *Salmonella enteritidis* in spent hens. **Avian Diseases** v.36, p.251-255, 1992

WHO-World Health Organization. **Campylobacter**. Disponível em http:\\www.who.int. Acesso em julho de 2004.

WHO - World Health Organization. **WHO consultation on the monitoring of antimicrobial usage in food animals for the protection of human health**; Oslo, Norway. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Toxicology**. In: **Safety and nutritional adequacy of irradiated food.** Ed. WORLD HEALTH ORGANIZATION, p. 81-108. 1997.

Capítulo 06

Qualidade e Tratamento da Água no Controle de Adesão Microbiana na Indústria de Alimentos

1. Introdução
2. Monitoramento da Qualidade da Água
   - 2.1 Características Sensoriais
   - 2.2 Indicadores de Riscos à Saúde
   - 2.3 Indicadores da Formação de Incrustações
   - 2.4. Indicadores de Poluição
   - 2.5. Indicadores da Qualidade Microbiológica
3. Aspectos do Tratamento da Água
   - 3.1. Potabilização da Água
   - 3.2 Tratamentos Específicos de Água na Indústria de Alimentos
4. Referências

Nélio José de Andrade

A água usada na indústria de alimentos deve ser de boa qualidade uma vez que é um insumo fundamental.

1. Introdução

Os microrganismos surgiram em meio aquoso e, a partir desse ambiente, adaptaram-se também ao solo, ar, plantas, trato intestinal de homens e animais, pele de manipuladores e, ainda, em lagos, lagoas, rios e mares, que constituem as fontes primárias da contaminação dos alimentos. O controle de qualidade da água para qualquer uso na indústria de alimentos é necessário para evitar possíveis riscos à saúde dos consumidores dos produtos comercializados. Esse controle reduz efeitos negativos que as características físicas, químicas e microbiológicas da água podem provocar na indústria, como processos corrosivos, depósitos de matéria orgânica e sedimentos; além de auxiliar a fabricação de alimentos que atendam aos critérios de qualidade exigidos dos produtos industrializados. A água pode ser usada como um componente da formulação de um produto e participa de várias etapas do processamento, além de estar em contato com alimentos, equipamentos e utensílios e ser usada para lavagem de mãos e asseio pessoal.

A indústria de alimentos deve oferecer sua contribuição à sociedade, no que se refere à utilização racional da água e, para tanto, tem de usar esse recurso natural renovável, já considerado escasso, com consciência, bom senso e tecnologia adequada. Apenas a conscientização para a economia pode reduzir em até 30 % o gasto de água no processamento de alimentos. Sabe-se que a atividade industrial no Brasil onde estão inseridas as indústrias alimentícias consome 10 % da água total gasta pelos diversos setores (Figura 1). A atividade agrícola consome 70 %, e o consumo humano utiliza os 20 % restantes. Do total da água na Terra, apenas pequena parte, cerca de 1 % é potável ou pode ser potabilizada, encontrada em rios e lagos, dentre outros. Além disso, prevê-se que a escassez de água já constatada em várias regiões da Terra se aprofunde e se estenda a outras áreas nos próximos anos. Em um "ranking" proposto por organizações internacionais, baseado na pontuação obtida não apenas em função da quantidade disponível, o Brasil ocupa a 50ª posição dentre 147 países avaliados (Tabelas 1 e 2).

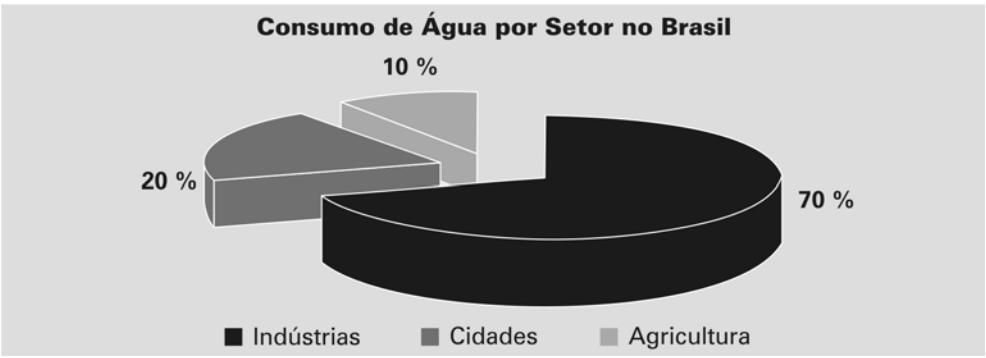


Figura 1 - Consumo de água por diversos setores de atividade no Brasil.

Tabela 1 - Critério para a classificação dos países quanto à saúde hídrica

1. Quantidade de água doce por habitante	20 pontos
2. População com água potável e esgoto tratado	20 pontos
3. Renda, saúde, educação, desigualdade social	20 pontos
4. Desperdício doméstico, industrial e agrícola	20 pontos
5. Poluição da água e preservação ambiental	20 pontos

Tabela 2 - Classificação de alguns países quanto à saúde hídrica

Classificação	País	Pontuação
1°	Finlândia	78,0
2°	Canadá	77,7
5°	Guianas	75,8
16°	Chile	68,9
34°	Japão	64,8
39°	Espanha	63,8
50°	Brasil	61,2
74°	México	57,5
100°	Índia	53,2
106°	China	51,1
135°	Angola	41,3
147°	Haiti	35,1

O Brasil que, a princípio, estaria classificado na 12ª posição, considerando apenas a quantidade disponível, não é bem avaliado em relação, por exemplo, ao porcentual da população que é atendida com o fornecimento de água potável e com tratamento de esgoto, ou em relação ao controle do desperdício doméstico, agrícola ou industrial. Além disso, o Brasil está longe de ser considerado um país-modelo no que se refere ao controle da poluição dos mananciais nem à sua preservação. Apesar de o país apresentar boa quantidade de água passível de ser potabilizada, deve-se lembrar de que a maior parte se encontra na região Amazônica e que existem áreas, como algumas partes no Nordeste, onde a escassez é uma realidade preocupante.

A água para consumo humano e uso na indústria de alimentos deve atender aos padrões físicos, químicos e microbiológicos estabelecidos na legislação brasileira, de acordo com a Portaria nº 518, do Ministério da Saúde, publicada em 25 de março de 2004 (Tabela 3). A água é aceita como potável quando se encontra dentro de certos requerimentos de qualidade. Já foram detectados cerca de 2.000 contaminantes diferentes na água; aproximadamente 700 deles foram encontrados em água potável, demonstrando a dificuldade em se determinar quais as análises devem ser realizadas para se definir a qualidade da água. As entidades e os organismos nacionais, como os Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Agência Nacional da Água, ou internacionais, entendem que, na impossibilidade de uma análise de todos

esses possíveis contaminantes, a qualidade da água seja avaliada por determinado número de análises de grupos representativos da qualidade, com a finalidade de ser monitorada. As metodologias analíticas para determinação dos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e de radioatividade devem atender às especificações de entidades nacionais e, ou, internacionais. São amplamente aceitas as metodologias publicadas na edição mais recente do *"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater",* de autoria das instituições *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF) ou as metodologias publicadas pela *International Standartization Organization (*ISO).

Tabela 3 - Legislações importantes para o uso da água na indústria de alimentos

Usos de mananciais	Resolução 357, CONAMA 2005
Padrões de potabilidade	Portaria n° 518 , MS, 2004
Política nacional de recursos hídricos	Lei n° 9433/1997
Sanções penais	Lei n° 9605/1998

2. Monitoramento da Qualidade da Água

A qualidade da água para consumo humano e seu uso na indústria de alimentos devem ser controlados de forma contínua pelos responsáveis pela operação de sistema de tratamento de água ou solução alternativa de abastecimento de água. Esse controle consiste de um conjunto de medidas e análises destinadas a verificar se a água fornecida à população é potável. Soluções alternativas de abastecimento de água na indústria de alimentos incluem fonte, poço comunitário, distribuição por veículo transportador e instalações condominiais horizontal e vertical.

Para melhor avaliar a qualidade, a indústria deve considerar a água uma matéria-prima e usar planos de amostragem adequados. Em algumas situações, sugere-se a aplicação de planos completos em que a água seria submetida às análises previstas na legislação, incluindo, por exemplo, uso de um novo manancial, grande mudança no tratamento e grande mudança no sistema de distribuição. Os planos completos são aplicáveis durante a implantação da indústria e repetidos anualmente naquelas em funcionamento. Planos reduzidos são propostos quando se conhecem a qualidade do manancial, o histórico da qualidade da água, os tratamentos prévios e os riscos de contaminação. Além disso, a freqüência de análises é dependente de vários fatores, dentre eles se inclui o fato de ser água de sistema de abastecimento público ou de soluções alternativas e dos pontos de amostragem. Assim, sugere-se que as análises de indicadores de poluição sejam realizadas semestralmente, que as análises dos indicadores da qualidade microbiológica sejam semanais e a de cloro residual, seja diária (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4 - Freqüência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, de acordo com o ponto de amostragem e o tipo de manancial

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento
Cor Turbidez pH	Superficial Subterrâneo	A cada duas horas
CRL(*)	Superficial Subterrâneo	Diária A cada duas horas Diária
Cianotoxinas	Superficial	Semanal
Tri-halometanos	Superficial Subterrâneo	Trimestral -
Demais parâmetros(**)	Superficial ou Subterrâneo	Semestral

Fonte: Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, MS. - (*) Cloro residual livre. (**) Apenas será exigida a obrigatoriedade de investigação dos parâmetros radioativos quando evidenciadas as causas de radiação natural ou artificial. (**) Dispensada a análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

Tabela 5 - Número mínimo de amostras para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, de acordo com o ponto de amostragem e o tipo de manancial

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento	Sistema de distribuição (reservatório e rede)
Cor Turbidez pH	Superficial Subterrâneo	1	10
CRL(*)	Superficial Subterrâneo	1 1 1	5 1 1
Cianotoxinas	Superficial	(Conforme § 5º do artigo 18)	-
Tri-halometanos	Superficial Subterrâneo	1 -	1(**) 1(***)
Demais parâmetros(**)	Superficial ou Subterrâneo	1	1(****)

Fonte : Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, MS - (*)Cloro residual livre.(**) As amostras devem ser coletadas, preferencialmente, em pontos de maior tempo de detenção da água no sistema de distribuição.(***) Apenas será exigida obrigatoriedade de investigação dos parâmetros radioativos quando evidenciadas as causas de radiação natural ou artificial.(****) Dispensada a análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

Tabela 6 - Número mínimo de amostras e freqüência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água de solução alternativa, para fins de análises físicas, químicas e microbiológicas, em razão do tipo de manancial e do ponto de amostragem

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento (para água canalizada)	Número de amostras coletadas*	Freqüência de amostragem
Cor, turbidez, pH e coliformes totais	Superficial Subterrâneo	1	1	Semanal
CRL(*)	Superficial ou Subterrâneo	1	1	Diário

Fonte ; Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, MS. - (*) Para veículos transportadores de água para consumo humano, deve ser realizada uma análise de CRL em cada carga e uma análise, na fonte de fornecimento, de cor, turbidez, pH e coliformes totais com freqüência mensal, ou outra amostragem determinada por autoridades responsáveis pela saúde pública.

Acerca da freqüência das análises de água, dois aspectos devem nortear essa decisão: a exigência da legislação e as especificidades de cada indústria, quando deve prevalecer o conhecimento aliado ao bom senso dos técnicos responsáveis pelo uso da água.

A legislação atual prevê a análise de cerca de 90 parâmetros que, sem dúvida, é um número bastante elevado. As análises propostas fundamentam-se em cinco grupos principais (Tabela 7).

Tabela 7 - Grupos de análises propostos para avaliar a qualidade da água

Grupos	Exemplos de análise
A: Características sensoriais	Cor , sabor, odor e turbidez
B: Riscos à saúde humana	Metais pesados, pesticidas, solventes orgânicos, nitratos, nitritos e microrganismos patogênicos
C: Indicadores de depósitos, incrustações e corrosão	Cobre, ferro, zinco, cálcio, magnésio, cloretos, sulfatos, sílica, bicarbonatos/ácido carbônico e oxigênio
D: Indicadores de poluição	Amônia, nitrito, nitrato e cloretos
E: Análises microbiológicas	Contagem total de mesófilos, coliformes totais e fecais, *Escherichia coli*, protozoários e cianobactérias

Fonte: Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, MS.

As metodologias para análises de água são selecionadas de acordo com diversos fatores; dentre esses, podem-se citar: limite de detecção; precisão e rapidez; equipamentos disponíveis; nível de treinamento de laboratoristas; custo da análise; e exigências específicas de legislação. Aquelas usadas no Brasil fundamentam-se em propostas de entidade de reconhecimento internacional, como APHA e AOAC (*American Oficial Analytical Chemist*). Na Tabela 8, são mostrados os padrões exigidos pela legislação brasileira para alguns parâmetros das análises

2.1. Características Sensoriais

No grupo relacionado às análises sensoriais estão os testes de turbidez, cor, sabor e odor. A turbidez é causada por material de qualquer natureza em suspensão, como plânctons, bactérias, argila, areia e poluição de forma geral. A água potável deve apresentar turbidez menor que 5 UT (Unidades de Turbidez), determinada no nefelômetro.

A cor não deve ser superior ao valor máximo permitido pela Portaria 518/MS, que é de 15 uH (Unidade Hazen - PtCO/L). A cor é definida pela decomposição de matéria orgânica e, também, pela presença de íons metálicos, como ferro e manganês, plânctons e resíduos industriais.

A legislação exige que a água não apresente sabor nem odor que impeçam seu consumo. Poluição industrial ou doméstica, matéria orgânica e atividade biológica de microrganismos são responsáveis pela ocorrência de sabor e odor na água.

Tabela 8 - Alguns padrões de qualidade exigidos pela Resolução nº 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), e Portaria nº 518, do Ministério da Saúde, no que se refere aos mananciais (para água doce) e água potável, respectivamente)

Parâmetro	Unidade	Resolução nº 357/CONAMA	Portaria nº 518/MS
Alumínio	$mg.L^{-1}$	0,1	0,2
Cloreto	$mg.L^{-1}$	250	250
Cor aparente	uH	A característica do manancial	15
Dureza	$mg.L^{-1}$	500	500
Ferro	$mg.L^{-1}$	0,3	0,3
Manganês	$mg.L^{-1}$	0,1	0,1
Monoclorobenzeno	$mg.L^{-1}$		0,12
Odor	-		Não objetável
Nitrogênio amoniacal Total (como NH_3)	$mg.L^{-1}$	3,7 para pH < 7,5 2,0 para 7,5<pH <8,0 1,0 para 8,0<pH < 8,5 0,5 para pH> 8,5	1,5
Gosto	-		Não objetável
pH	-	6,0-9,0	6,0-9,5
Sódio	$mg.L^{-1}$	-	200
Sólidos dissolvidos totais	$mg.L^{-1}$	500	1.000
Sulfato	$mg.L^{-1}$	250	250
Sulfeto de hidrogênio	$mg.L^{-1}$	0,002	0,05
Surfactantes	$mg.L^{-1}$	0,5	0,5
Turbidez	UT	100	5
Zinco	$mg.L^{-1}$	0,18	5
Xileno	$mg.L^{-1}$	300	0,3

2.2. Indicadores de Riscos à Saúde

No grupo referente aos riscos à saúde humana estão as análises de metais pesados, pesticidas, solventes orgânicos, nitratos, nitritos e microrganismos patogênicos, dentre outros. Esses contaminantes são oriundos, por exemplo, de resíduos industriais ou contaminação fecal. Os valores máximos permitidos podem ser encontrados na Portaria nº 518/MS (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentrações máximas para algumas substâncias químicas na água que representam risco à saúde

INORGÂNICAS		ORGÂNICAS	
Parâmetro	**VMP ($mg.L^{-1}$)**	**Parâmetro**	**VMP ($\mu g.L^{-1}$)**
Antimônio	0,005	Acrilamida	0,5
Arsênio	0,01	Benzeno	5
Bário	0,7	Benzo[a]pireno	0,7
Cádmio	0,005	Cloreto de vinila	5
Cianeto	0,07	1,2 Dicloroetano	10
Chumbo	0,01	1,1 Dicloroeteno	30
Cobre	2	Diclorometano	20
Cromo	0,05	Estireno	20
Fluoreto	1,5	Tetracloreto de carbono	2
Mercúrio	0,001	Tetracloroeteno	40
Nitrato (como N)	10	Triclorobenzeno	20
Nitrito (como N)	1	Tricloroeteno	70
Selênio	0,01		

Fonte: Portaria nº 518/MS, de 25 de março de 2004.

AGROTÓXICOS			
Parâmetro	**VMP ($mg.L^{-1}$)**	**Parâmetro**	**VMP ($\mu g.L^{-1}$)**
Alaclor	20,0	Hexaclorobenzeno	1
Aldrin e dieldrin	0,03	Lindano (g-BHC)	2
Atrazina	2	Metolacloro	10
Bentazona	300	Metoxicloro	20
Clordano (isômeros)	0,2	Molinato	6
2,4 D	30	Pendimetalina	20
DDT (isômeros)	2	Pentaclorofenol	9
Endossulfan	20	Permetrina	20
Endrin	0,6	Propanil	20
Glifosato	500	Simazina	2
Heptacloro e heptacloro epóxido	0,03	Trifluralina	20
		Microcistinas	1,0

Fonte: Portaria nº 518/MS, de 25 de março de 2004. VMP = valor máximo permitido.

2.3. Indicadores da Formação de Incrustações

Um terceiro grupo de análises inclui aquelas que indicam possibilidade de formação de incrustações e corrosão e é representado pelos sais minerais, ácidos e gases presentes, que mostram grande importância em processos de adesão microbiana e formação de biofilmes. Os locais onde ocorrem corrosões e, ou, depósitos minerais geralmente são apropriados para o desenvolvimento de microrganismos. Esses eventos alteram a microtopografia das superfícies que processam alimentos,

facilitando a deposição de matéria orgânica, nutrientes e microrganismos. As incrustações desses minerais muitas vezes são denominadas "pedras", no dia-a-dia da indústria, e, assim, ocorrem as formações minerais conhecidas como pedras do leite e pedras da cerveja. No caso de laticínios, essas incrustações são constituídas de minerais da água, principalmente aqueles responsáveis pela dureza, como cálcio e magnésio, minerais dos detergentes e sanitizantes, como sódio, fósforo e cloretos, resíduos de proteínas, gordura, açúcares, vitaminas e sais minerais do leite (Tabela 10). Além disso, nessas incrustações podem-se agregar microrganismos de origens diversas, como aqueles presentes no ar, na água, nos manipuladores e no próprio alimento. Esses microrganismos, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, atingem números elevados e, ao se liberarem, contaminam os alimentos processados nessas superfícies incrustadas.

Tabela 10 - Composição típica de uma pedra de leite

Constituintes	Porcentagem
Carboidrato	10
Gordura	15
Proteína	25
Sais minerais	50

Na indústria de alimentos, é aconselhável o uso de água com pH próximo de 8,3, já que não contém acidez, evitando processos de corrosão em superfícies para processamento de alimentos. A acidez na água é causada pela absorção do CO_2 atmosférico ou oriunda de material vegetal em decomposição e da atividade biológica de microrganismos. O ácido carbônico e os bicarbonatos - de sódio, cálcio, magnésio, ferro e manganês, dentre outros - presentes na água formam um tampão. Em pH próximo de 4,6, predomina o ácido carbônico e, em pH próximo de 8,3, prevalece o ânion bicarbonato, de acordo com a metodologia analítica que usa os indicadores fenolftaleína e metilorange e a titulação com solução de NaOH. Em virtude do tampão formado pelo ácido carbônico e bicarbonatos, a água pode apresentar acidez e alcalinidade simultaneamente, dependendo do pH. Por exemplo, as águas naturais da região da Zona da Mata de Minas Gerais têm entre 5 e 20 $mg.L^{-1}$ de acidez, expressa em CO_2, e entre 10 e 50 $mg.L^{-1}$ de alcalinidade, expressa em $CaCO_3$.

Em água com pH abaixo de 4,6, a acidez é denominada mineral, devido à presença de ácidos minerais, provenientes provavelmente da poluição industrial ou do metabolismo microbiano. De acordo com a legislação vigente, a água é considerada potável com pH entre 6 e 9,5, já a de um manancial será considerada em condições de ser potabilizada quando o pH estiver numa faixa de 5 a 9,5. A água usada em

caldeiras deverá ter seu pH corrigido para valores entre 10,5 e 11,5, para evitar processos corrosivos ao aço carbono, constituinte de caldeiras.

A alcalinidade da água ocorre em virtude da presença de bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos de sódio, cálcio, magnésio e ferro. Os bicarbonatos acontecem quando a água tem pH abaixo de 8,3. Outros tipos de sais responsáveis pela alcalinidade são encontrados em água com pH igual ou superior a 8,3. As águas potáveis não podem apresentar alcalinidade de hidróxido, cuja presença indica a ocorrência de poluição. À exceção nesse caso é para a água de alimentação de caldeiras, cujo pH deve ser corrigido para valores entre 10,5 e 11,5 com substâncias alcalinas, de forma a liberar uma alcalinidade cáustica entre 400 e 700 $mg.L^{-1}$, expressa em OH-.

A alcalinidade apresenta relação com a dureza quando constituída de bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos de cálcio e de magnésio, que originam a dureza da água, causadora de uma série de problemas para a indústria de alimentos. Plenamente aceitáveis para água potável, em que concentrações de 500 $mg.L^{-1}$ de dureza, expressa em $CaCO_3$, não apresenta significado sanitário, a dureza pode ser responsável por processos corrosivos e formação de incrustações em diversas superfícies e equipamentos de processamento de alimentos, particularmente em trocadores de calor. Além disso, as incrustações diminuem o fluxo em tubulações, reduzem a transferência de calor, por exemplo, provocando maior gasto de energia para a produção de vapor em caldeiras, além de poderem causar contaminação microbiana de alimentos com diversos microrganismos.

Na Tabela 11 são apresentados resultados de análises físicas e químicas de amostras de água de um sistema de tratamento e de uma indústria de laticínios, em que se observam diferenças nos resultados analíticos devido à composição da água.

Tabela 11 - Características físicas e químicas de amostras de água coletadas em um sistema de tratamento e em uma indústria de laticínios

Amostras	Turbidez (UT)*	pH	Acidez ($mg.L^{-1}$)**	Alcalinidade ($mg.L^{-1}$)**	Cloretos ($mg.L^{-1}$)****	Dureza ($mg.L^{-1}$)***
Água bruta	46,6	7,1	7,8	42,9	11,9	36,3
Água floculada	91,5	7,0	10,4	43,0	13,9	42,2
Água decantada	12,5	7,1	8,8	46,3	14,9	40,7
Água filtrada	0,5	7,0	7,1	42,0	17,7	39,0
Água para resfriamento de leite	4,4	7,0	8,0	50,5	16,2	43,2
Água industrial	1,0	6,9	7,6	33,3	14,6	41,3
Vapor condensado	3,8	7,2	7,8	23,8	13,4	20,0
Água para resfriamento de amônia	18,6	8,6	0,0	231,7	140,3	183,0

*Unidades Turbidez **Expressos em CO_2 ***Expressos em $CaCO_3$ ****Expressos em NaCl

A turbidez variou entre 0,5 UT na água filtrada e 91,5 na água dos floculadores do sistema de tratamento. O pH oscilou entre 6,9 e 8,6 na água industrial e do sistema de resfriamento de amônia, respectivamente. Em relação à acidez, observou-se desde ausência na água de resfriamento de amônia até 10,4 $mg.L^{-1}$, expressos em CO_2, na amostra coletada no floculador. O vapor condensado apresentou o menor conteúdo de alcalinidade, com 23,8 $mg.L^{-1}$, expressos em $CaCO_3$. A água do sistema de resfriamento da amônia, coletada na torre de resfriamento, tinha concentração mais elevada com 231,7 $mg.L^{-1}$. Quanto à concentração de cloretos, a água mostrou o menor nível, ou seja, 11,9 $mg.L^{-1}$ de NaCl, e a água do sistema resfriamento da amônia, o maior, atingindo 140,3 $mg.L^{-1}$.

A dureza variou entre 20 $mg.L^{-1}$ e 183 $mg.L^{-1}$ de $CaCO_3$ no vapor condensado e na água de resfriamento de amônia, respectivamente. Observou-se, pelos resultados, que a água apresenta qualidade tal que depende do uso e tratamentos recebidos e que há necessidade de maior controle por meio de análises e de um plano de amostragem adequado para seu melhor uso na indústria de alimentos

As análises físicas e químicas das amostras coletadas no manancial encontram-se dentro dos padrões propostos pela Resolução n° 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 2005. Da mesma forma, as características da água industrial atenderam à Portaria n° 518, do Ministério da Saúde, de 2004.

Na Tabela 12 são apresentadas as análises físicas e químicas da água usada em cinco microindústrias de laticínios, ressaltando-se que estas necessitavam de subsídios tecnológicos para produção de alimentos com melhor qualidade. O conhecimento das condições higiênicas de processamento nesses pequenos estabelecimentos é uma das maneiras de buscar a produção de leite e derivados com melhor qualidade higiênico-sanitária, e a avaliação da qualidade da água é um aspecto importante que deve ser considerado na produção de alimentos seguros para o consumidor.

Tabela 12 - Características físico-químicas da água de microindústrias de laticínios

Análises	Microindústrias				
	A	B	C	D	E
pH	6,9	5,9	6,7	7,4	6,4
Dureza ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	18,7	15,3	43,3	24,7	24,7
Alcalinidade total ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	21,3	20,3	50,7	20,0	31,7
Acidez ($mg.L^{-1}$ CO_2)	21,3	22,0	15,0	22,7	22,7
Cloretos ($mg.L^{-1}$ NaCl)	7,7	4,0	3,3	8,7	5,3
Cloro residual livre ($mg.L^{-1}$ Cl_2)	-	-	-	+	-

As cinco microindústrias de laticínios avaliadas à época da pesquisa não tinham Selo de Inspeção Municipal e foram codificadas como A, B, C, D e E. A qualidade físico-química da água indica pequeno risco de incrustações, mas as análises

microbiológicas mostraram a necessidade do controle dos níveis de cloro residual livre, constatando-se que as microindústrias apresentaram resultados considerados normais nas análises físico-químicas, à exceção do cloro residual livre.

Os valores de pH variaram entre 5,9 e 7,4, portanto encontram-se dentro dos padrões da legislação vigente (Portaria 518/MS), que indica valores de 6 a 9,5. Os valores de dureza das águas analisadas entre 15 e 43 $mg.L^{-1}$ de $CaCO_3$ classificam-nas como água mole ($\leq$ 50 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$), não oferecendo grandes riscos de formar incrustações. Constatou-se que as concentrações de cloreto nas águas analisadas foram muito baixas, entre 3 e 9, expressas em $mg.L^{-1}$ de NaCl, quando comparadas com o limite máximo permitido pela legislação, que é de 250 $mg.L^{-1}$, indicando pequeno risco de formação de incrustações e de processos corrosivos. Em relação ao cloro residual livre, cujo objetivo é o controle microbiológico, foi constatada a sua presença apenas nas amostras de água de uma microindústria, que, à época, usava água do sistema municipal de tratamento.

2.4. Indicadores de Poluição

Um quarto grupo de substâncias presentes na água compreende os indicadores de poluição, em que estão incluídas as análises de amônia, nitrato e nitrito. A presença dessas substâncias nitrogenadas, dependendo da concentração, indica poluição fecal.

2.5. Indicadores da Qualidade Microbiológica

Um quinto grupo de análises está relacionado à ocorrência de microrganismos na água. Na Tabela 13 são apresentados os padrões microbiológicos da água, exigidos pela Portaria nº 518/MS.

Entende-se por coliformes totais as bactérias do grupo coliforme, representado por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a 35,0 $\pm$ 0,5 °C em 24-48 h, podendo apresentar atividade da enzima β-galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia, Citrobacter, Klebsiella e Enterobacter,* embora outros gêneros e espécies possam ser incluídos.

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a 44,5 $\pm$ 0,2 °C, em 24 h, tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal. A *Escherichia coli* é um espécie bacteriana do grupo coliforme que fermenta lactose e manitol, com produção de ácido e gás a 44,5 $\pm$ 0,2 °C em 24 h, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa a uréia e apresenta atividade das enzimas β-galacto-

sidase e β-glucoronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos.

Tabela 13 - Padrões microbiológico de potabilidade da água para consumo humano

	Parâmetro	Valor máximo permitido (VMP)
Água para consumo humano	*Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes (44,5 +/- 0,2 °C)	Ausência em 100mL
Água na saída do tratamento	Coliformes totais	Ausência em 100mL
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	*Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100mL
	Coliformes totais (35 +/- 0,5 °C)	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100ml em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100ml
	Contagem de heterotróficos (35 +/- 0,5 °C)	Até $5,0x10^2$ UFC.ml-1, devendo serem analisadas 20 % das amostras em que realizaram testes para coliformes

Fonte: Portaria 518 de 25 de março de 2004.

Em 20 % das amostras de água analisadas quanto a coliformes totais nos sistemas de distribuição, exige-se que seja realizada a contagem de bactérias heterotróficas, que não deve exceder $5,0x10^2$ UFC.mL^{-1}. A contagem de bactérias heterotróficas consiste na determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriado, como o ágar para contagem-padrão, sob condições preestabelecidas de incubação, ou seja, 35,0 ± 0,5 °C por 48 h.

Para avaliação adequada da qualidade microbiológica da água, recomenda-se a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp., por representarem sérios perigos a indivíduos imunodeprimidos ou, mesmo, saudáveis. Em água que recebe o tratamento de filtração rápida, cuja turbidez esteja inferior a 0,5 UT, há considerável segurança de que enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. foram removidos.

A exposição do homem a esses parasitas envolve várias rotas complexas e interligadas, que culminam com a ingestão de água ou alimentos contaminados

com oocistos, que são estruturas reprodutivas altamente resistentes ao cloro. Basicamente, a presença desses protozoários no meio ambiente se deve à contaminação ambiental por esgoto doméstico e rural, além da contaminação por fezes de animais domésticos e silvestres. Sua presença na cadeia alimentar se associa ao uso de água contaminada na indústria de alimentos, subprocessamento, matéria-prima contaminada, sejam produtos de origem animal ou vegetal, particularmente os minimamente processados, bem como contaminação via manipuladores de alimentos com hábitos inadequados de higiene pessoal ou portadores assintomáticos ou convalescentes.

Uma breve descrição sobre os gêneros anteriormente mencionados e sua importância e riscos para questões de saúde pública será feita a seguir.

Cryptosporidium spp./*Cryptosporidium parvum*

O primeiro caso de criptosporidiose humana foi relatado em 1976, e, desde essa época, casos e surtos não param de ser mencionados. Tanto homens como animais, em especial bovinos, podem ser reservatórios desse protozoário. A dose infectiva é considerada baixa, e apenas 10 oocistos já podem desencadear a doença. O processo infectivo ocorre no intestino delgado, onde os protozoários se multiplicam na forma sexuada e assexuada no citoplasma das células epiteliais, culminando o ciclo com a liberação de oocistos pelas fezes. O período de incubação da doença pode variar de 2-10 dias. Os sintomas mais comuns são diarréia, vômitos e dores abdominais, geralmente sendo necessária a hospitalização. A invasão de outros tecidos e órgãos também pode ocorrer. A grande particularidade desse protozoário, que o torna tão importante para questões de saúde pública, corresponde à sua resistência à cloração.

Considera-se que as etapas de floculação, sedimentação e filtração sejam eficientes na eliminação desse agente, porém, quando essas fases são realizadas de forma inadequada, esses protozoários podem chegar ao homem. O surto mais divulgado pela literatura ocorreu em Milwaukee, EUA, em 1993, acometendo 403.000 pessoas, em razão do consumo de água contaminada, levando 104 pessoas HIV positivos a óbito. O surto ocorreu devido a processos inadequados de remoção de oocistos durante as etapas de coagulação/sedimentação no tratamento da água. O surto, além dos danos provocados à saúde de milhares de consumidores, ainda acarretou grandes prejuízos às empresas de alimentos locais, principalmente as produtoras de bebidas. Esse protozoário é suscetível ao ozônio, à radiação UV e ao tratamento térmico de 71,7 °C por 15 seg.

Giardia spp. (*G.duodenale, G. lamblia, G. intestinale*)

Os protozoários deste gênero, responsáveis por distúrbio denominado giardíase, são os mais isolados no mundo, sendo estimados, aproximadamente, 2,5 milhões de casos, por ano, nos EUA. O cistos, estruturas de resistência a agentes químicos, depois de ingeridos liberam os tropozoídeos, estágio reprodutivo, no duodeno, onde estes se multiplicam assexuadamente, colonizando rapidamente o intestino delgado e liberando oocistos nas fezes. Os sintomas mais freqüentes são diarréia, flatulência e inchaço no abdômen, em razão de danos provocados na mucosa intestinal. A dose infectiva pode variar de 10-100 cistos. O período de incubação normalmente varia de uma e duas semanas, podendo a doença prevalecer por até cinco dias. Assim como *Cryptosporidium* sp., microrganismos pertencentes a esse gênero também são resistentes à cloração, sendo as etapas de floculação, sedimentação e filtração eficientes na redução desses agentes. Caso a água utilizada não receba qualquer tratamento, recomenda-se fervê-la por pelo menos 1 min, sendo o tratamento de 71,5 °C por 15 seg já suficiente para eliminar oocistos. Esse protozoário é suscetível a sanitizantes à base de fenol.

Cyclospora sp.

Embora existam muitas espécies neste gênero, apenas *C. cayetanensis* tem sido associado ao homem, sendo reconhecido como patógeno desde 1977. Seu ciclo de vida ainda não está totalmente esclarecido, mas já se sabe que esses protozoários se multiplicam nas células do intestino delgado, culminando com a liberação de oocistos nas fezes. O período de incubação varia de 2 a11 dias, podendo a doença se estender por duas semanas. Os sintomas incluem diarréia não-sanguinolenta, perda de apetite e peso, cólica estomacal, náusea, vômito, fadiga e febre. Poucos estudos têm sido desenvolvidos para determinar o comportamento desses protozoários diante de agentes de desinfecção, assim pouco se sabe sobre sua resistência ao cloro nos níveis usados no tratamento da água.

Toxoplasma gondii

A toxoplasmose é uma zoonose, ou seja, doença transmitida entre animais e homens, sendo os felinos os hospedeiros primários. Dentre os hospedeiros secundários, incluem-se outros vertebrados, como roedores, bem como bovinos e outros animais relacionados à produção animal. Quando os oocistos são ingeridos por esses hospedeiros, ocorre a liberação de esporozoídeos que se multiplicam assexuadamente, colonizando rapidamente o intestino delgado. Esses esporozoídeos podem invadir outros tecidos e órgãos do corpo do hospedeiro, via sistemas circulatório e linfático, ocorrendo a formação de cistos nos tecidos. A ingestão de tecidos infectados pode desencadear um mecanismo infectivo semelhante à ingestão de oocistos, como ocorre, por exemplo, no consumo de carne contaminada. A infecção pode ser sintomática ou assintomática, sendo o inchaço das glândulas linfáticas, fadiga e dores nas articulações e musculaturas os sintomas mais freqüentes.

Com relação aos protozoários, faz-se necessário conhecer aspectos fisiológicos, virulência, viabilidade e sobrevivência desses patógenos a tratamentos empregados na indústria de alimentos e a qualidade dos suprimentos de água para que estratégias de controle sejam traçadas. Porém, os aspectos biológicos e ecológicos complexos, como ciclo de vida e os cistos altamente resistentes apresentados por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Cyclospora* spp. dificultam sua prevenção e controle. Associadas a essas questões, ainda existem as dificuldades impostas pela carência de técnicas de análises apropriadas e padronizadas para detecção e enumeração desses agentes.

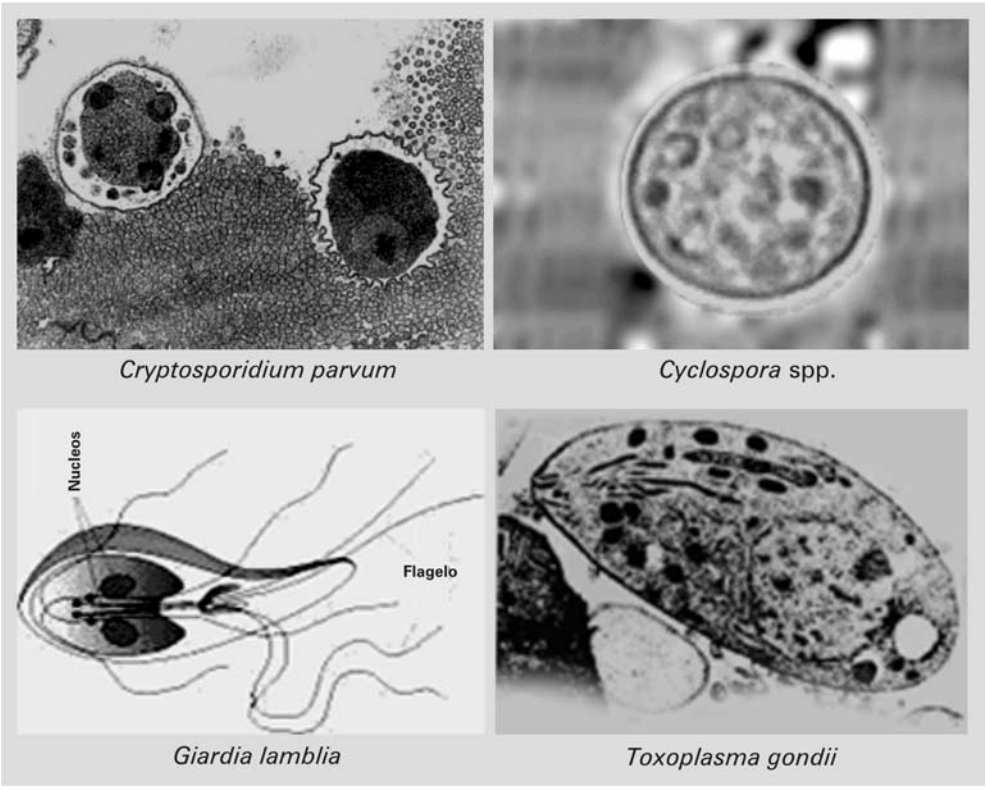


Figura 1 - Ilustrações de células vegetativas de protozoários.

As técnicas de controle incluem preocupação com a sanidade animal, qualidade da água empregada na produção e irrigação; adoção de técnicas adequadas de higiene na produção e processamento de alimentos; atenção a todas as etapas do tratamento convencional da água, tanto aquela a ser utilizada na produção primária e na indústria, bem como em atividades recreacionais e, se possível, introduzir etapas que podem reduzir esses agentes; e manejo adequado de resíduos (esgoto), de forma a minimizar a disseminação de oocistos no ambiente.

Cianobactérias

Em relação aos aspectos microbiológicos da água, há a preocupação com a presença de cianobactérias, microrganismos procarióticos autotróficos, também denominados cianofíceas ou algas azuis, capazes de ocorrer em qualquer manancial superficial, especialmente naqueles com elevados níveis de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, podendo produzir toxinas com efeitos adversos à saúde quando ingeridas. Dentre elas, podem-se citar: i) as microcistinas, que são hepatotoxinas heptapeptídicas cíclicas, com efeito potente de inibição de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A, que são promotoras de tumores; ii) cilindrospermopsinas, que são alcalóides guanidínicos cíclicos, inibidores de síntese protéica, predominantemente hepatotóxicos, apresentando também efeitos citotóxicos nos rins, baço, coração e outros órgãos; e iii) saxitoxinas, que pertencem ao grupo de alcalóides carbamatos neurotóxicos, não sulfatados (saxitoxinas) ou sulfatados (goniautoxinas e C-toxinas) e derivados decarbamil, apresentando efeitos de inibição da condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio.

O controle microbiológico da água está intimamente relacionado à concentração de cloro residual livre, e, normalmente, considera-se que uma água contendo de 0,2 a 1,0 mg.L^{-1} de cloro residual livre é segura dentro desse ponto de vista. No entanto, não se elimina a necessidade de realizar as análises microbiológicas, para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento. Na Tabela 14 são apresentados resultados de análise de amostras de água coletada em um sistema de tratamento de um laticínio.

Tabela 14 - Número de aeróbios mesófilos e coliformes totais em amostras de água coletadas em um sistema de tratamento de uma indústria de laticínios

Amostras	Mesófilos aeróbios (UFC.mL^{-1})	Coliformes totais (NMP.$100mL^{-1}$)
Água bruta	$6,5x10^2$	400
Água floculada	$1,2x10^2$	1071
Água decantada	$4,4x10^3$	110
Água filtrada	$1,5x10^2$	7
Água clorada	$1,2x10^2$	<2
Água de resfriamento de amônia	$1,5x10^2$	6

Observa-se que as amostras apresentaram contagens de aeróbios mesófilos entre $2,7x10^0$ UFC.mL^{-1} e $4,4x10^3$ UFC.mL^{-1} para água industrial e resfriamento de amônia, respectivamente.

As contagens de coliformes totais, expressas em NMP.mL^{-1}, foram tão baixas quanto <2 e tão altas quanto $1,1x10^3$ para água floculada.

Na Tabela 15 são apresentadas as contagens de aeróbios mesófilos e coliformes totais nas microindústrias de laticínios já mencionadas. Verificou-se, pelos resultados, que pelo menos uma das análises para mesófilos aeróbios efetuadas nas microindústrias A, B e C apresentou contagens acima de 500 UFC.mL^{-1}, limite máximo recomendado pela legislação. Todas as análises nas microindústrias A, B, E e uma análise da C apresentaram coliformes totais acima de 3 NMP.100 mL^{-1}. A microindústria D utilizava água do sistema de abastecimento municipal, apresentando, assim, os melhores resultados microbiológicos. Esses resultados indicaram a necessidade de cloração da água, que deve apresentar níveis entre 0,2 e 1,0 mg.L^{-1} de cloro residual livre na água de consumo humano e, principalmente, entre 4 e 8 mg.L^{-1} de cloro residual livre para uso geral nas indústrias.

Tabela 15 - Características microbiológicas da água das microindústrias de laticínios

Análises realizadas				
Micro indústrias	Repetições	Mesófilos aeróbios (UFC. mL^{-1})	Coliformes totais (NMP.100 mL^{-1})	Coliformes fecais (NMP.100 mL^{-1})
A	1	Nd	3	< 3
	2	$9{,}1 \times 10^{2}$	9	< 3
	3	$2{,}7 \times 10^{2}$	39	9
B	1	$1{,}7 \times 10^{2}$	9	9
	2	$1{,}9 \times 10^{3}$	9	<3
	3	$4{,}0 \times 10^{2}$	9	<3
C	1	Nd	4	<3
	2	$4{,}5 \times 10^{2}$	<3	<3
	3	$4{,}5 \times 10^{3}$	<3	<3
D	1	$<1{,}0 \times 10^{0}$	<3	<3
	2	$1{,}1 \times 10^{2}$	<3	<3
	3	$<1{,}0 \times 10^{0}$	<3	<3
E	1	$2{,}1 \times 10^{1}$	3,6	3,6
	2	$5{,}1 \times 10^{1}$	4	<3
	3	$2{,}7 \times 10^{2}$	43	<3

nd = Não determinada.

A água, quando não adequadamente clorada, veicula grande número de microrganismos alteradores ou patogênicos. Dentre os alteradores, encontram-se espécies psicrotróficas dos gêneros *Pseudomonas, Aeromonas, Alcaligenes, Flavobacterium* e *Achromobacter*. As espécies *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* e *A. hydrophila* são exemplos de microrganismos formadores de limosidades em superfícies usadas no processamento de alimentos capazes de aderir e formar biofilmes. Também, espécies esporulantes dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* podem ser veiculadas pela água. Já as espécies *C. tyrobutiricum* e *B. coagulans* são alteradoras e responsáveis pelo estufamento tardio de queijo e pela coagulação do leite UAT, respectivamente. Dentre as alteradoras, incluem-se ainda as

do grupo coliforme, em que sobressaem *E. coli*, responsável pela produção de uma série de ácidos orgânicos nos alimentos; e *E. aerogenes*, causadora do estufamento precoce de queijo. Outro grupo de microrganismos que podem ser veiculado pela água são espécies do gênero *Enterococcus*, representado por *E. faecium*, microrganismo que apresenta estirpes psicrotróficas, acidificantes de leite e resistentes ao tratamento térmico de 65 °C por 30 min.

Vários microrganismos patogênicos em suas formas vegetativas ou esporulantes são veiculados pelas água. Os alimentos podem ser contaminados com *Clostridium botulinum, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhi*, Salmonella paratyphi, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes, Escherichia coli H7: O157 e Vibrio cholerae,* dentre outros.

É interessante, portanto, observar a importância do tratamento correto da água e do controle do processo de desinfecção ou, mais especificamente, do processo de cloração.

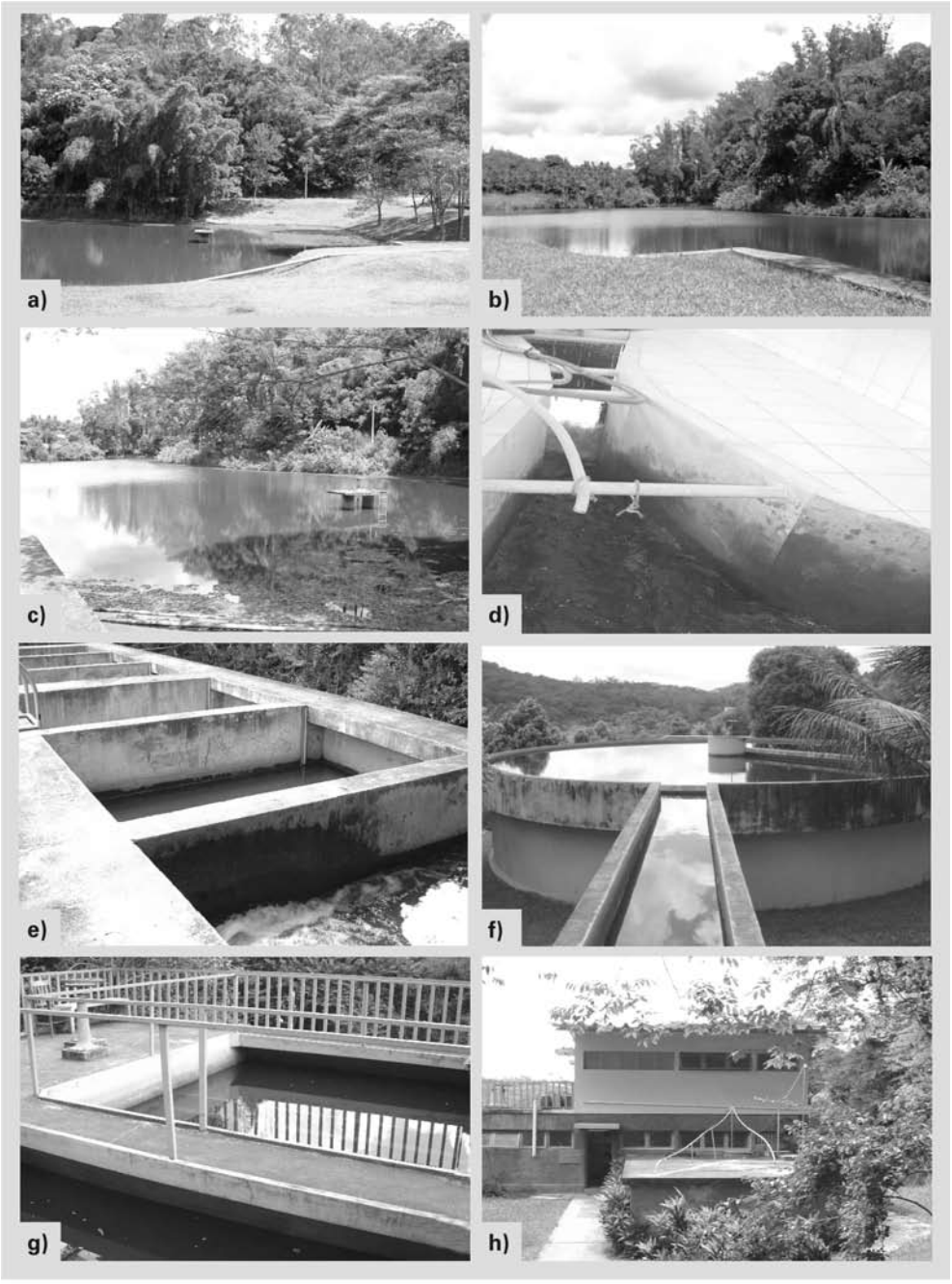
3. Aspectos do Tratamento da Água

3.1. Potabilização da Água

Na indústria de alimentos, usa-se água dos sistemas de abastecimento público ou é providenciado o tratamento proveniente de diversos mananciais, como rios, lagos, lagoas e poços artesianos, dentre outros. Para atingir a qualidade exigida pela legislação vigente, a água passa por diversas etapas, ou seja, a sedimentação simples, a sedimentação com agentes coagulantes, a decantação, a filtração e a desinfecção (Figuras 2 e 3).

A sedimentação simples ocorre nos mananciais onde há melhoria na qualidade da água, ocorrendo a deposição de partículas mais pesadas, em virtude do processo de decantação e redução no número de microrganismos aderidos às partículas responsáveis pela turbidez. Também, nas lagoas, nos rios e lagos, ocorre um efeito bactericida da radiação ultravioleta emitida pelo sol que, dependendo da turbidez da água, é capaz de penetrar a certas profundidades

Nesse processo de sedimentação, partículas muito pequenas poderiam demorar anos para se depositarem até atingir valores menores de 1 UT de turbidez. Por isso, a etapa de sedimentação com agentes coagulantes é fundamental para obter água com a qualidade que se deseja na indústria de alimentos. Normalmente são utilizadas substâncias químicas que formam hidróxidos em solução aquosa, principalmente originários de sulfatos de alumínio ou de ferro. O hidróxido formado tem carga elétrica positiva e adsorve as partículas negativas responsáveis pela turbidez, cor, sabor e odor (Reações Químicas 1), resultando no aumento do diâ-



Fonte - Estação de Tratamento de Água da Universidade Federal de Viçosa

Figura 2 - Etapas de um tratamento convencional de água: a), b), c) vistas de um manancial, d) mistura rápida dos agentes de floculação, e) floculação, f)-decantação, g) filtração e h) tanque de cloração por contato.

metro e na densidade das partículas. Nesse caso, a velocidade da sedimentação fundamenta-se na Lei de Stokes (Equação 1), sendo proporcional à densidade e ao quadrado do diâmetro das partículas. Assim, esses agentes reduzem a turbidez da água rapidamente para valores propostos pela legislação vigente. Para a formação de hidróxidos, a água deve apresentar alcalinidade adequada, naturalmente presente ou adicionada.

Reações Químicas 1 - Formação de hidróxido de alumínio a partir do sulfato de alumínio

1. $Al_2(SO_4)_3 + 3Ca(HCO_3)_2 \rightleftharpoons 3CaSO_4 + Al(OH)_3 + CO_2$
   Sulfato de alumínio + Bicarbonato de cálcio → Sulfato de cálcio + Hidróxido de alumínio
2. $Al_2(SO_4)_3 + 2Na_2CO_3 \rightleftharpoons 3Na_2SO_4 + Al(OH)_3$
   Carbonato de sódio → Sulfato de sódio
3. $Al_2(SO_4)_3 + 3Ca(OH)_2 \rightleftharpoons 3CaSO_4 + Al(OH)_3$
   Hidróxido de sódio

Equação 1 - Lei de Stokes que determina a velocidade de sedimentação das partículas na água em razão de vários fatores

$$V = \frac{\delta s - \delta e}{9\mu} \times g \times r^2$$

V = Velocidade final de sedimentação
δs = Peso específico de partícula
δe = Peso específico da água
μ = Viscosidade do líquido
g = Aceleração da gravidade
r = Raio da partícula

A ação de agentes coagulantes ocorre nos floculadores, havendo, inicialmente, uma mistura rápida entre a água e o agente químico, que é obtida pelo aumento da velocidade da água, e, em seguida, essa velocidade é diminuída para que haja formação adequada dos flóculos, o que acontece geralmente no último floculador. Na seqüência, a água é transferida para o decantador, onde os flóculos se depositam antes do processo de filtração. A etapa de floculação é simulada no laboratório, para determinar a quantidade de agente químico a ser adicionada à água. Essa simulação é efetuada pelo Teste do Jarro, que consiste em adicionar certas concentrações da substância floculante e, com o auxílio da análise de turbidez, determinar qual quantidade do floculante origina flóculos adequados tanto no aspecto técnico quanto econômico.

A etapa de filtração, geralmente realizada em filtros de areia, é responsável pela retenção dos flóculos não sedimentados no decantador, pela redução do número de microrganismos e pela complementação da redução da turbidez da água. Após a filtração, a turbidez da água deve apresentar no máximo 5 UT, de acordo com a Portaria 518/MS. É necessário proceder-se à desinfecção que é normalmente feita pela cloração, para que se atinjam os índices microbiológicos exigidos. Assim, a água deve apresentar <2 NMP.100mL^{-1}, que é considerado au-

sência por 100 mL, para coliformes totais na estação de tratamento e <2 NMP.100 mL^{-1} para coliformes fecais ou termotolerantes a 45 °C, em pontos do sistema de distribuição. Para a análise, é aplicada a técnica do Número Mais Provável (NMP) em três séries de cinco tubos, sendo utilizados volumes de 10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL da amostra. Podem ser usados vários meios de cultura, por exemplo Caldo Verde Brilhante para coliformes totais e Caldo EC para coliformes termotolerantes, com incubação a 37 e 45 °C, respectivamente.

Após a incubação, determina-se o que se denomina número-chave, que consiste dos tubos positivos - produção de gás nos tubos de Durham - em cada série. Com base no número-chave, determina-se o NMP.100 mL^{-1} por meio de uma tabela apropriada. Por exemplo, se o número-chave for 521, a contagem de coliformes será de 70 NMP.100 mL^{-1}, de acordo com tabela própria. Geralmente, o processo de desinfecção atinge seus objetivos quando a água contiver entre 0,2 e 1,0 $mg.L^{-1}$ de CRL.

3.2. Tratamentos Específicos da Água na Indústria de Alimentos

O ideal seria se as indústrias de alimentos dispusessem de tecnologias para realizar tratamentos específicos em razão do uso da água (Tabela 16 e Figuras 4, 5, 6 e 7). Assim, água para caldeiras, resfriamento de produtos enlatados esterilizados, controle da microbiota da superfícies de carnes e de frutas e hortaliças minimamente processadas, diluição de bebidas destiladas e concentrados e fermentação de cervejas são situações que demonstram a necessidade de tratamentos específicos da água pela indústria (Tabela 17).

Na indústria de alimentos, deve-se usar água mole, com concentrações abaixo de 50 $mg.L^{-1}$ de dureza. A ação de calor e alcalinos sobre os sais responsáveis pela dureza é mostrada nas reações químicas 2. Nesse caso, essa água, se utilizada em caldeiras, dever ter sua dureza corrigida para valores próximos de zero, por meio do tratamento interno, realizado nas caldeiras. Para isso, utilizam-se, geralmente, fostatos, polifosfatos e sais sódicos do EDTA. Esses produtos ou suas formulações podem ser adquiridos em empresas especializadas, sob diversos nomes comerciais. Como informação, pode-se afirmar que o fosfato trissódico atua por precipitação da dureza, o que não é conveniente, pois haverá depósitos na superfície do aço carbono. Os polifosfatos, em contrapartida, atuam sobre a dureza por formação de quelatos com os sais, não ocorrendo, portanto, a deposição. A capacidade de formação de quelatos é variável de acordo com o polímero; por exemplo, 1,0 g de hexametafosfato de sódio complexa cerca de 74 mg de dureza. Outros polifosfatos, como o tripolifosfato de sódio e o tetrafosfato de sódio são capazes de quelar, respectivamente, 57 e 38 mg de dureza por grama do quelante. O EDTA-Na e o gluconato de sódio atuam seqüestrando os sais responsáveis pela dureza, e cada miligrama dessas substâncias seqüestram 200 e 300 mg de dureza, respectivamente; no entanto, são de custo mais elevado do que os polifosfatos.

Tabela 16 - Alguns dos usos da água na indústria de alimentos

Uso pessoal
Geração de vapor
Sistemas de resfriamento
Procedimentos de higienização
Controle de microbiota em vegetais, frutas, carcaças bovinas, suínas e aves
Diluição de xaropes (refrigerantes)
Diluição de bebidas alcoólicas
Processos fermentativos (cervejaria)

Tabela 17 - Alguns tratamentos específicos da água na indústria de alimentos

Água de alimentação de caldeiras	i) Ausência de dureza ii) pH entre 10,5 e 11,5 iii) Alcalinidade cáustica entre 300 e 700 $mg.L^{-1}$, em NaOH iv) Cloretos, no máximo 50 $mg.L^{-1}$ de NaCl para caldeiras de média pressão (entre 11 e 40 $kgf.cm^{-2}$) e no máximo de 200 $mg.L^{-1}$ para caldeiras de baixa pressão (até10 $kgf.cm^{-2}$)
Água para resfriamento de amônia	Remoção de dureza e controle da qualidade microbiológica
Água do tanque de água gelada	Abrandamento e controle da qualidade microbiológica
Processo fermentativo para produção de cervejas	Remoção de cloro e flúor (se for o caso) Controle dos teores de sais
Água para o procedimento de higienização	Abrandamento e controle microbiológico
Água para diluição de concentrados de refrigerantes	Remoção de matéria orgânica e controle microbiológico

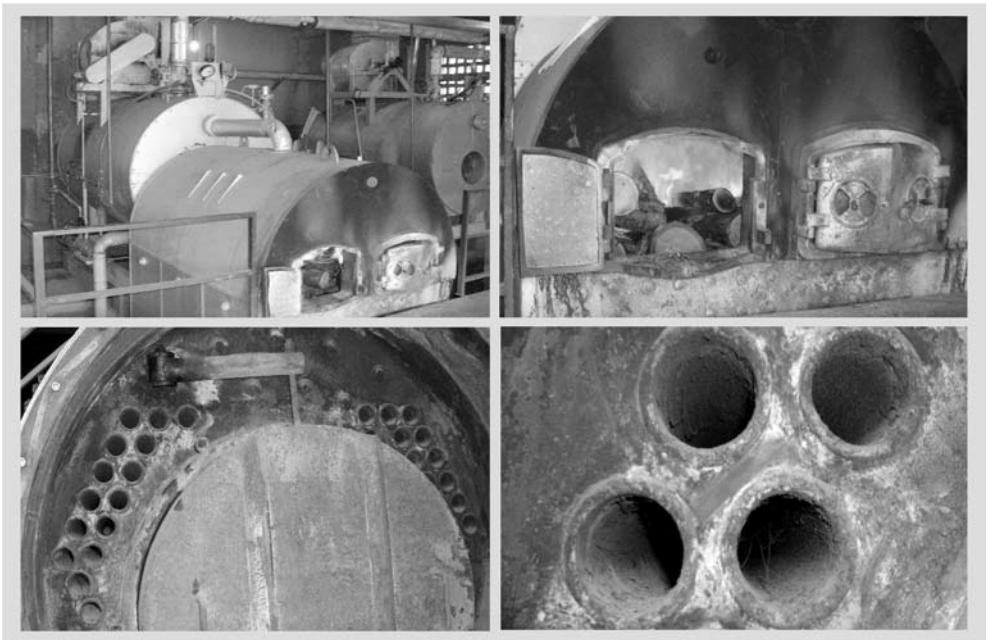


Figura 4 - Caldeira flamotubular, à lenha e de baixa de pressão, de uso comum na indústria de alimentos.

Figura 5 - a), b), c) Incrustações minerais em caldeiras; d) Válvula para controle de purga; e) Realização de uma purga.

Figura 6 - Aspectos de um sistema de resfriamento da amônia: a) torre de resfriamento, b) condensador e c) tubos contendo amônia sendo resfriada.

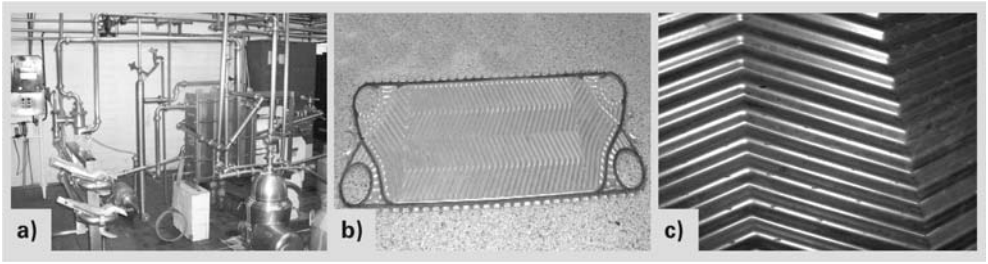


Figura 7 - a) trocador de calor, b) placa do trocador e c) pontos de corrosão na placa.

Reações Químicas 2 - Ação de calor e alcalinos sobre os sais responsáveis pela dureza

1. $Ca(HCO_3)_2$ + calor ⇌ $CaCO_3 + H_2O + CO_2$
   Bicarbonato de cálcio (solúvel) — Carbonato de cálcio (insolúvel)

2. $Mg(HCO_3)_2$ + calor ⇌ $MgCO_3 + H_2O + CO_2$
   Bicarbonato de magnésio (solúvel) — Carbonato de magnésio (pouco solúvel)

3. $Ca(HCO_3)_2 + 2NaOH$ ⇌ $CaCO_3 + Na_2CO_3 + 2H_2O$
   Hidróxido de sódio — Carbonato de sódio

4. $Mg(HCO_3)_2 + 2NaOH$ ⇌ $MgCO_3 + Na_2CO_3 + H_2O$

5. $CaCl_2 + Na_2CO_3$ ⇌ $CaCO_3 + 2\,NaCl$
   Cloreto de cálcio — Cloreto de sódio

6. $Mg(NO_3)_2 + 2\,NaOH$ ⇌ $Mg(OH)_2 + 2\,Na(NO)_3$
   Nitrato de magnésio — Hidróxido de magnésio — Nitrato de sódio

7. $CaSO_4 + Na_2CO_3$ ⇌ $CaCO_3 + Na_2SO_4$
   Sulfato de cálcio — Sulfato de sódio

8. $MgSO_4 + Na_2CO_3 + Ca(OH)_2$ ⇌ $Mg(OH)_2 + CaCO_3 + Na_2SO_4$
   Sulfato de magnésio — Hidroxido de magnésio

Mesmo quando a água é classificada como mole, podem ocorrer processos de incrustações em superfícies de troca de calor. Por isso, sugere-se que os detergentes utilizados no procedimento de higienização sejam formulados com agentes quelantes ou seqüestrantes. Por exemplo, na indústria de processamento de leite condensado e fabricação de leite em pó, onde há possibilidade de formação de grossas películas de gordura e proteína, contendo minerais e microrganismos, recomenda-se uma formulação de detergente alcalino com 95 % de hidróxido de sódio adicionado de 5 % de um seqüestrante como o EDTA-Na, que será usada na concentração de 1 % a 80 °C.

Quando a água é classificada como moderadamente dura, com concentrações de dureza entre 51 e 150 mg.L^{-1} ou dura com valores entre 151 e 300 mg.L^{-1} ou, ainda, muito dura com índices de dureza acima de 300 mg.L^{-1}, a indústria de alimentos deve utilizar outras alternativas. Uma alternativa tecnologicamente viável é aquela que utiliza trocadores de cátions para a remoção dos sais de cálcio e magnésio.

Nesse caso, podem ser usadas as resinas sintéticas, por exemplo as constituídas de poliestireno, como matriz polimérica. Essas resinas geralmente têm um porcentual de divinilbenzeno entre 5 % e 8 % e ácido sulfônico ou sulfonato de sódio, que são o sítio ativo de troca de cátions. Essa resina mencionada como exemplo, dentre outras, pode ser usada como leito filtrante em reatores ou filtros, onde os sais causadores da dureza ficam retidos, liberando a água mole. As resinas apresentam determinada capacidade de troca e, após um tempo de uso, devem ser regeneradas; processo geralmente realizado pela lavagem do filtro em contracorrente com uso de ácido forte, para as resinas à base de ácido sulfônico e solução de cloreto de sódio, em concentrações entre 5 % e 10 %, para aquelas à base de sulfonato de sódio. Por meio da troca iônica, pode-se eliminar a dureza ou reduzi-la a valores mais baixos e usar as outras alternativas de tratamento e controle. Se a água disponível para uma indústria de latícinios tem em sua composição 120 mg.L^{-1} de dureza, recomenda-se: i) reduzir essa concentração para valores próximos de zero e utilizá-la na geração de vapor em caldeiras; e ii) diminuir a concentração dos sais de cálcio e magnésio para 50 mg.L^{-1} ou, a um valor próximo a esse, efetuar o tratamento interno da água de alimentação das caldeiras e adquirir detergentes com agentes abrandadores para realizar a higienização em superfícies para processamento de alimentos.

Outro ânion de importância relevante, constituinte da composição da água, é o cloreto. Em água potável ou potabilizada, é aceita a concentração de até 250 mg.L^{-1} de cloreto, expressos em NaCl, de acordo com a Portaria 518/MS. Concentrações elevadas de cloreto indicam possibilidades de poluição, por meio de resíduos domésticos ou industriais ou devido à atividade agrícola, em que fertilizantes como cloreto de potássio são comumente aplicados.

O íon cloreto é sinônimo de corrosão na indústria de alimentos e, em concentrações elevadas, podem corroer o aço carbono em caldeiras. Nesses geradores de vapor, a análise de cloreto é usada como indicador da possibilidade de corrosão. Recomenda-se para a água de alimentação de caldeira de baixa pressão, de até 10 kgf.cm^{-2}, que as concentrações de cloreto sejam inferiores a 200 mg.L^{-1}. Para caldeiras de média pressão, entre 10 e 40 kgf.cm^{-2}, normalmente são usadas na indústria de alimentos concentrações de até 50 mg.L^{-1}. Recomenda-se água de alimentação com ausência de cloretos, para evitar problemas de corrosão, em caldeiras de alta pressão, acima de 40 kgf.cm^{-2}; que, no entanto, não são utilizadas na indústria de alimentos. O cloreto em caldeiras é controlado por meio de purgas, que consistem na abertura periódica de uma válvula ou registro na caldeira, para se promover a denominada desconcentração de sais no interior da caldeira. O intervalo de tempo entre as purgas depende da concentração

de sais de cálcio e magnésio na água. Recomendam-se, por exemplo, intervalos de quatro horas quando a dureza da água atingir 10 mg.L^{-1}. Intervalos de três, duas e uma h são recomendados quando a água de alimentação das caldeiras apresentar de 11 a 20 mg.L^{-1}, de 21 a 30 mg.L^{-1} e de 31 a 40 mg.L^{-1} de dureza, respectivamente.

Águas contendo concentrações elevadas de ferro e manganês também são prejudiciais à indústria de alimentos. Esses elementos, mesmo em concentrações de 0,3 e 0,1 mg.L^{-1}, respectivamente, consideradas normais em água potável, podem participar de processos de corrosão e formação de incrustações em superfícies. Por exemplo, excesso de ferro na água usada em procedimentos de higienização de sistema de ultrafiltração de leite bloqueia os poros das membranas, dificultando a higienização dos equipamentos.

As soluções cloradas são amplamente usadas na indústria de alimentos, e as concentrações de cloro residual livre vão depender do uso específico. Na maioria das aplicações, sugere-se que a água seja clorada em concentrações acima daquela exigida pela Portaria 518/MS (Tabela 18).

Tabela 18 - Concentrações de cloro residual recomendados para alguns usos específicos na indústria de alimentos

Uso específico	mg.L^{-1} de cloro residual livre
Água potabilizada	0,2-1,0
Controle de micobiota/carcaças: bovinos, suínos, aves	5-8
Resfriamento de enlatados esterilizados	5-10
Controle de microbiota/superfícies: frutas e hortaliças	50-200
Sanitização de superfícies: aço inoxidável, poletileno, polipropileno, policarbonato e vidro, dentre outras	100-200
Higienização de ovos	200

Recomenda-se que a água usada rotineiramente na indústria de alimentos apresente uma concentração entre 4 e 8 mg.L^{-1} CRL. Esse procedimento, conhecido como cloração na indústria, traz uma série de benefícios no dia-a-dia, por reduzir limosidade de origem microbiana nos ambientes de processamento e diminuir odores indesejáveis, além de contribuir para a obtenção de alimentos com menor contagem microbiana, estendendo a vida de prateleira desses víveres.

Teores de cloro entre 5 e 10 mg.L^{-1} de CRL são utilizados para a água de resfriamento de produtos enlatados esterilizados, como leite condensado, milho verde e ervilhas. Após o tratamento térmico, esses alimentos devem ser resfriados da maneira mais rápida possível, para temperatura ambiente, e não podem permanecer à temperatura próxima de 50 °C por tempo prolongado, uma vez que favorece o desenvolvimento de microrganismos termofílicos esporulantes que, geralmente, são aqueles que sobrevivem ao tratamento da esterilização comercial. Particularmente, naquelas embalagens com espaço vazio na parte superior há formação de vácuo

que pode favorecer a entrada de água. Se esta estiver contaminada e ocorrerem pequenos orifícios na embalagem, o alimento seria contaminado com um número grande e diversificado de microrganismos.

O uso da água clorada também é comum no controle microbiológico de superfícies de alimentos e nas soluções contendo 200 $mg.L^{-1}$ de CRL indicadas para o controle microbiológico de vegetais minimamente processados. Para redução da microbiota de superfícies de carnes bovinas, suínas e de aves, sugere-se a aspersão de água clorada em concentrações entre 5 $mg.L^{-1}$ e 7 $mg.L^{-1}$ de CRL. Os ovos, imediatamente antes de serem quebrados para a produção de ovo líquido pasteurizado, devem ser imersos em soluções contendo 200 $mg.L^{-1}$ de CRL, durante 1 a 2 min.

A água clorada é ainda amplamente usada para a etapa de sanitização do procedimento geral de higienização de equipamentos e utensílios. Nesse caso, são recomendadas soluções cloradas de 100 $mg.L^{-1}$ de CRL quando o procedimento de sanitização é imersão ou circulação e 200 $mg.L^{-1}$ quando o procedimento é aspersão ou nebulização.

Diversos compostos são usados no processo de desinfecção da água ou no preparo de soluções cloradas (Tabela 19). O cloro gás, comercializado na forma líquida, em cilindros apropriados, é geralmente utilizado em estações de tratamento de água. O hipoclorito de sódio encontrado sob a forma líquida, com teores entre 2 % e 10 % de CRT, é bastante aplicado na etapa de sanitização do procedimento de higienização na indústria de alimentos. O hipoclorito de cálcio, um produto em pó, contendo cerca de 60 % de CRT , também pode ser utilizado, embora, às vezes, apresente problemas de solubilidade

Esses compostos clorados inorgânicos são instáveis ao armazenamento e muito reativos com a matéria orgânica; e, em razão disso, águas contendo ácidos fúlvicos e húmicos, oriundos de matéria orgânica em fase final de decomposição, podem reagir com esses compostos e ocorrer a formação de tri-halometanos, conhecidos como THM. Esses compostos representados pelo triclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano e tribromometano são considerados nocivos à saúde, pois existem evidências de que relacionam com câncer de intestino. A Portaria 518/MS exige que a concentração de THM totais não ultrapasse a 100 $\mu g.L^{-1}$. Para controle dos níveis desses compostos na água, dentre as alternativas disponíveis e viáveis, estão o controle dos precursores, que pode ser realizado durante o tratamento convencional da água, nas etapas de floculação, decantação e filtração, e o uso de agentes clorados menos reativos com a matéria orgânica. Na Tabela 20 são apresentadas concentrações de THM presentes na água tratada com cloro gasoso. Na Tabela 21 são mostradas as concentrações de triclorometano e bromodiclormetano encontradas em águas já cloradas em um sistema de abastecimento público de água formadas por um agente clorado inorgânico, o hipoclorito de sódio, e outro, clorado orgânico, o dicloroisocianurato de sódio.

Tabela 19 - Compostos clorados aplicados na desinfecção da água

Compostos inorgânicos	Cloro residual total (%)
Cloro gás (Cl_2)	100
Hipoclorito de sódio (NaClO)	1-10
Hipoclorito de cálcio ($Ca(ClO)_2$)	70-72
Dióxido de cloro (ClO_2)	17
Compostos orgânicos	**Cloro residual total (%)**
Dicloroisocianurato de sódio	70
Tricloroisocianurato de sódio	89-90
Diclorodimetil hidantoína	66
Dicloramina T	56-60
Cloramina T	24-26

O dióxido de cloro, por exemplo, é um composto clorado inorgânico cerca de 2,7 vezes mais oxidante do que o cloro gás, por conter em sua molécula o oxigênio, além do cloro, e ser muito menos reativo com matéria orgânica. No entanto, esse composto apresenta dificuldades operacionais, pois deve ser gerado no próprio local de uso, por meio de equipamentos especiais, pela mistura controlada de clorito de sódio ($NaClO_2$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou cloro gás mais clorito de sódio. Isso significa que há necessidade de treinamento dos operadores, para evitar acidentes de trabalho e ensiná-los a usar corretamente as soluções geradas. Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente soluções estabilizadas de dióxido de cloro.

Tabela 20 - Formação de tri-halometanos na água após a desinfecção com Cl_2

Trihalometano	Concentração ($\mu g.L^{-1}$)
Triclorometano	48,97
Bromodiclorometano	7,70
Tri-halometanos totais	56,67

Fonte: Macêdo,1997.

Tabela 21 - Concentrações de triclorometano e bromodiclorometano após a desinfeção com 7 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre, a partir de hipoclorito de sódio e diclorosiocinaurato de sódio

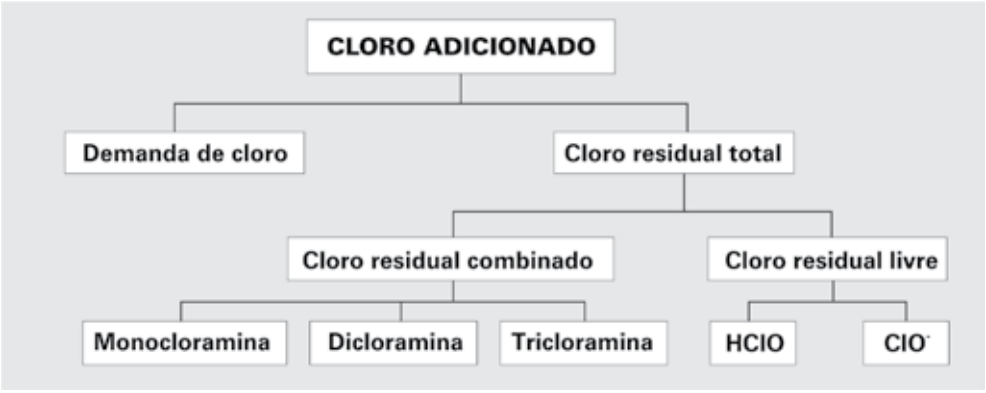
Tri-halometano	Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	
	Hipoclorito de sódio	Dicloroisocianurato de sódio
Triclorometano	63	Não detectado
Bromodiclorometano	16	Traços
Tri-halometanos totais	79	Traços

Fonte: Macêdo,1997.

As cloraminas orgânicas são bastante estáveis ao armazenamento, são comercializadas na forma de pó e pouco reativas com matéria orgânica. As principais cloraminas orgânicas são o dicloroisocianurato de sódio, o tricloroisocianurato de

sódio, a cloramina T, a dicloramina T e o diclorodimetilhidantoína. Essas substâncias apresentam concentrações diferentes de princípio ativo, que devem ser levadas em consideração no preparo das soluções de uso. Por exemplo, existe comercialmente um produto à base de diclorosiocianurato de sódio contendo cerca de 3 % de CRT e outro com 5 % de CRT. Naturalmente, as quantidades desses produtos, necessárias para o preparo de 1.000 L de uma solução, contendo 200 $mg.L^{-1}$ de CRL, serão diferentes. Nesse caso, seriam pesados e diluídos no volume de 1.000 L de água 6,67 kg e 4 kg dos produtos com 3 e 5 % de CRT, respectivamente. Isso mostra que no preparo e uso correto das soluções cloradas é importante que se conheça a concentração do princípio ativo dos diversos produtos clorados disponíveis no mercado, por meio de metodologia simples de titulação, baseada em reação de oxirredução entre cloro e tiossulfato de sódio.

É necessário conhecer as reações do cloro na água para que seja entendida a terminologia empregada na cloração (reações químicas 3). Uma vez que, ao ser adicionado à água, ele reage com sais minerais e com a matéria orgânica. Esse cloro consumido atende à demanda e, nessa oportunidade, pode ocorrer a formação dos tri-halometanos. O restante do cloro está presente na forma de cloro residual total, que compreende o somatório das concentrações de monocloraminas, dicloraminas e tricloraminas inorgânicas, que se formam no processo de cloração, e das concentrações de ácido hipocloroso (HClO) e do íon hipoclorito (ClO^-).



Reações químicas 3 - Reações do cloro na água

O cloro residual total pode ser determinado por diferentes métodos. Por exemplo, pelas técnicas do DPD (*N,N-dietil-p-phenylenediamine*), de amplo uso em estações de tratamento de água. Pode ser determinado também por métodos de oxirredução, geralmente usado na avaliação de concentrações elevadas de cloro. No caso da técnica titulométrica, a solução clorada é acidificada, para que todo o cloro seja transformado em Cl_2 e, em seguida, promove-se uma reação de oxirredução entre o Cl_2 e o KI, em que o Cl_2 é reduzido para Cl^- e o I^- é oxidado para I_2. Assim, a quantidade de I_2 formada na reação é equivalente à de Cl_2 e pode ser determinada

pela titulação com $Na_2S_2O_3$. Um mililitro de $Na_2S_2O_3$ 0,01 N equivale a 0,3545 mg de cloro residual total. Na seqüência, por meio de cálculos matemáticos, determina-se a concentração de cloro residual total, expressa em $mg.L^{-1}$ de CRT, em Cl_2. Por exemplo, o hipoclorito de sódio comercial de uso comum na indústria de alimentos geralmente contém 10 % de cloro residual total.

A concentração de cloro residual livre é o somatório das concentrações de ácido hipocloroso e do íon hipoclorito. Esse tipo de cloro é determinado por diferentes métodos nas estações de tratamento de água; dentre eles, incluem-se os testes da ortotolidina e do DPD. A ortotolidina, suspeita de causar danos à saúde humana, tem sido substituída pelo DPD. Por exemplo, determinada estação de tratamento de água libera ao consumo água contendo entre 0,8 e 1,0 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre, expresso em Cl_2. Após a desinfecção, a água tratada na estação deve conter um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 $mg.L^{-1}$, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 $mg.L^{-1}$ em qualquer ponto da rede de distribuição, recomendando-se que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 e tempo de contato mínimo de 30 min.

Não existe método de laboratório que determine a concentração de ácido hipocloroso na água. Essa determinação é muito importante, uma vez que é o ácido hipocloroso, forma não dissociada, o responsável pela atividade bactericida dos agentes clorados. A forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a dissociada. Por meio da equação de Henderson-Hasselblach, é possível determinar a concentração do ácido hipocloroso na água (reações químicas 4 e Equação 2). Para isso, é necessário que se conheçam a concentração de cloro residual livre e o pH da água. Por exemplo, uma água contendo 0,8 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre com um pH de 7,5 tem 0,4 $mg.L^{-1}$ de ácido hipocloroso. Da mesma forma, se o pH da água for 8,5 ou 6,5, as concentrações de ácido hipocloroso serão, respectivamente, 0,07 e 0,73 $mg.L^{-1}$, conforme determinado pela Equação 2.

$$Cl_2 + H_2O \rightleftharpoons HClO + HCl$$

$$NaClO + H_2O \rightleftharpoons HClO + NaOH$$

$$Ca(ClO)_2 + H_2O \rightleftharpoons HClO + Ca(OH)_2$$

$$\diagdown\!\diagup N\text{-}Cl + H_2O \rightleftharpoons HClO + NH$$

$$HClO \rightleftharpoons ClO^- + H^+$$

Reações Químicas 4 - Formação do ácido hipocloroso na água

$$mg.L^{-1}\ de\ HClO = \frac{mg.L^{-1}\ de\ cloro\ residual\ livre}{1 + 10^{pH - 7,5}}$$

Equação 2 - Quantificação da concentração de ácido hipocloroso usando-se a equação de Henderson-Hasselbalch adaptada

O acido hipocloroso é capaz de atravessar a membrana celular dos microrganismos e, no citoplasma, inativar enzimas da via glicolítica, pela redução de grupos SH de aminoácidos constituintes dessas enzimas. Essa tem sido a teoria mais aceita para a ação antimicrobiana do cloro. No entanto, outras possibilidades para o mecanismo de ação desse agente sanitizante são mencionadas. Por exemplo, a reação do ácido hipocloroso com compostos nitrogenados da parede celular ou da membrana celular, ou de ambos, formando substâncias cloro-nitrogenadas tóxicas às células.

Dependendo da concentração e do pH, as soluções cloradas podem ser esporicidas, e, para isso, o ácido hipocloroso deve alterar a permeabilidade da capa do esporo, que contém cerca de 15 % de cisteína em sua composição, aminoácido responsável pela resistência da capa ao cloro, pois confere a essa camada do esporo uma estrutura semelhante ao fio de cabelo ou à queratina de insetos. No entanto, o esporo perde essa resistência a partir do momento em que o ácido hipocloroso consegue romper a capa, naturalmente em outros pontos dela, onde não está presente a cisteína. Há duas teorias que tentam explicar como o cloro inativa o esporo bacteriano. Em uma delas, afirma-se que, após o rompimento da capa, o esporo absorve água e nutrientes, germina, e o cloro elimina o esporo germinado, que já não apresenta resistência ao agente químico. Em outra, tem-se que, após a alteração da permeabilidade da capa, o cloro oxidaria as demais camadas constituintes do esporo até atingir o protoplasma, onde se encontram DNA, RNA, ribossomos e enzimas essenciais à transformação do esporo em célula vegetativa.

Um experimento comparou a resistência de formas vegetativas e esporuladas de *Bacillus subtilis*, às soluções cloradas, contendo 100 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre, em pH 9,8, à temperatura de 25 °C. Observou-se que o tempo para que a população de células vegetativas do microrganismo reduzisse em um ciclo logarítmico foi de 6 seg. Já nos esporos, esse tempo foi de 88 min, ou seja, 5.280 seg, que corresponde a uma resistência 880 vezes maior. No experimento, constatou-se que a fase que corresponde ao tempo necessário para que o agente químico rompesse a capa do esporo foi de 60 min. Soluções com pH 7,0 reduziram em um ciclo logarítmico a população dos esporos em apenas 30 segundos, com uma fase lag de 15 seg. Isso mostra a importância do pH das soluções cloradas na rotina de sanitização de uma indústria de alimentos, particularmente quando se deseja eliminar esporos bacterianos além de células vegetativas.

Referências

ANDRADE, N. J, **Higiene industrial (Análises físico-químicas de água, detergentes e sanitizantes)**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1984, 41 p.

ANDRADE, N. J. MACÊDO, J. A. **Higienização na Indústria de Alimentos**, Ed. Varela, São Paulo, 1996.

ANDRADE, N.J.; MARTYN, M.E.L. **A água na Indústria de Alimentos**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1993. 38p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. Washington: APHA, 1992. 646 p.

BRASIL Ministério da Saúde. Portaria 518, de 25 de março de 2004 Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de março de 2004.

BRASIL. (2005). Leis e Decretos etc. Resolução CONAMA no 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientes para seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências.**

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology** 2005

DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.th. 2001. Chapter. 3, p. 25-35.

FRAZIER, W.C.; WESTHORFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 3.ed Zaragoza: Editorial Acribia, 1978. 522 p.

GREEBERG, A. E.; CLESCERI, L. S . EATON, A. D. (Eds.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18.th. ed. American Public Health Association, 1992.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6.th ed Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers, 2000. 679 p.

LAGGER, J. R.; MATA, H. T.; PECHIN, G. H. et al. La importancia de la calidad del agua en produccion lechera. **Veterinaria Argentina**, v. 27, n. 165, p. 346-354, 2000.

MACÊDO, J.A.B.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P. et al. Formação de trihalometanos em soluções sanificantes utilizadas no processo de desinfecção em indústrias de alimentação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p. 216-230, 1999.

MACÊDO, J. A. B. **Determinação de trihalometanos em águas de abastecimento público e de indústria de alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 90f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa - Viçosa.

COSTA, P. D. **Avaliação da técnica de ATP-bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COSTA P. D.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. BRANDÃO, S. C. C. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37 p. 345-349, 2006.

PALUMBO, S. A.; RAJKOWSKI, K.T.; MULLER, A. J. Current approaches for reconditioning process water and its use in food manufacturing operations. **Trends in food Science &Technology**, v. 8, p. 69-74, 1997.

PORETTI, M. Quality control of water as raw material in the food industry. **Food Control**, v. 4, p. 79-83, 1990.

PORTO, R.L.; BRANCO, S.M.; CLEARY, R.W., et al. **Hidrologia ambiental**, São Paulo, SP: USP Imprensa Universitária, 1991. 414 p.

RUZANTE, J.M.; FONSECA, L.F.L. Água: mais um fator para atingir a qualidade do leite. **Revista Batavo**, v. 8, n. 108, p. 40-42, 2001.

SILVA, R. M. M. Especificações microbiológicas para ambientes, manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais. [s.l.:s.n.t.].

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3rd ed. American Public Health Association 1992. 1219 p.

YOKOYA, F. **Controle de qualidade, higiene e sanitização nas fábricas de alimentos**. São Paulo: Secretaria de Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 191 p.

YOKOIA, F. **Higiene e sanitização na fábrica alimentos.** São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio e Tecnologia, [s.d.]117p

Capítulo 07

Qualidade Microbiológica do Ar de Ambientes de Processamento na Indústria de Alimentos

1. Introdução

2. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Ar

- 2.1. Sedimentação em Placas
- 2.2. Impressão em Ágar

3. Resultados de Avaliação da Qualidade Microbiológica de Ar de Ambientes de Processamento

- 3.1. Em uma Unidade de Alimentação e Nutrição
- 3.2. Em uma Indústria de Processamento de Leite
- 3.3. Em Indústria de Produtos Cárneos
- 3.4. Em uma Microindústria de Processamento de Leite
- 3.5. Em Câmaras Refrigeradas de uma Indústria de Laticínios

4. Referências

Nélio José de Andrade
Valéria Costa Salustiano

1. Introdução

O ambiente em uma indústria de alimentos, dependendo das condições higiênicas e do tempo em que o produto permanece exposto, pode contaminá-lo. Superfícies de contato com alimentos e equipamentos sempre foram consideradas as fontes importantes de contaminação de produtos alimentícios. Entretanto, o estágio atual do desenvolvimento de equipamentos para processamento de alimentos e de instalação industriais permite uma higienização eficiente. A contaminação por microrganismos transportados pelo ar do ambiente de processamento tem sido constatada.

Na indústria, o ar pode entrar em contato com produtos alimentícios durante as diversas etapas de manipulação, armazenagem, processamento e embalagem. Deve-se atentar à possibilidade da contaminação dos produtos alimentícios com microrganismos patogênicos e, ou, alteradores provenientes do ar, comprometendo a segurança alimentar; além disso, a vida-de-prateleira e a qualidade do alimento também podem ser afetadas.

A busca do aumento da vida de prateleira tem levado a uma preocupação maior com a qualidade microbiológica do ar dos ambientes de processamento na indústria de laticínios, por exemplo, considerando que mesmo se presentes em baixo número, os microrganismos oriundos do ar podem causar deterioração. Uma pesquisa mostrou correlação elevada (r=0,86) entre o número de microrganismos presentes no ar ambiental na área de embalagem de leite e o número de microrganismos contaminantes do produto final. Calculou-se que durante 60 seg de exposição ao ambiente com contagens de $3{,}0x10^2$ UFC.m^{-3} a $3{,}9x10^3$ UFC.m^{-3} de ar, 1,5 % dos microrganismos presentes seriam capazes de contaminar 1 L de um produto embalado, em um recipiente com abertura de 100 cm^2 e, conseqüentemente, reduzir a vida de prateleira desse produto.

Os microrganismos, a partir de fontes ambientais, podem estar presentes em aerossóis e ser transportados como células isoladas ou aglomerados em partículas sólidas ou líquidas. Muitos pesquisadores reconhecem como fontes de aerossóis nas áreas de processamento de produtos lácteos a atividade de pessoal, os drenos do piso, os sistemas de ventilação, a comunicação entre salas distintas, o leite derramado no piso, os sistemas de transporte e a água usada sob pressão durante o procedimento de higienização. Quaisquer superfícies onde microrganismos possam aderir ou depositar irão agir como fontes de contaminação do ar, em condições apropriadas para a formação de aerossóis.

Resultante da atividade de pessoal, a contaminação microbiológica do ar é caracterizada por aerossóis formados por células vegetativas de bactérias, especialmente estafilococos, estreptococos, micrococos e outros microrganismos associados ao trato respiratório humano, cabelos e pele.

Os drenos contribuem para aumentar os níveis de bioaerossóis, quando a água corre para dentro destes, respinga ou forma bolhas. A quantidade de partículas viáveis detectada na contagem de bactérias transportadas pelo ar reduz proporcionalmente com o número de vezes em que os drenos são usados. Essa relação indica que a população microbiana que cresce nos produtos sólidos do interior dos drenos forma aerossóis que são contaminados pelo deslocamento do ar devido ao fluxo de água.

O sistema de ventilação, quanto presentes nas plantas de processamento, pode contribuir para a contaminação microbiológica do ar. Para que se obtenha um "design" ou manutenção adequada desse sistema, deve-se conhecer o movimento do ar através da fábrica, assim como a difusão das partículas pelo ar. Um sistema de ventilação eficiente pode, no entanto, auxiliar o controle de microrganismos do ambiente, contribuindo para a melhor qualidade microbiológica do ar, da temperatura ambiental e da umidade relativa do ambiente.

Em muitas situações, a contaminação de produtos por bioaerossóis ocorre em virtude do transporte de microrganismos de áreas adjacentes na linha de processamento; transporte esse que depende de um gradiente de concentração de microrganismo e de outros fatores, como a ventilação, e de um gradiente de temperatura e turbulência do ar no espaço de comunicação entre as salas.

De acordo com a forma de geração do ar e das condições ambientais, a dimensão dos bioaerossóis varia de 0,1 μm a mais de 100 μm de diâmetro, provocando um comportamento aerodinâmico diferenciado, influenciando bastante a difusão e deposição de partículas. Tais partículas podem conter bactérias, fungos filamentosos, leveduras, esporos, antígenos, toxinas, vírus, pólen de plantas e material fecal.

Células vegetativas de bactérias podem estar presentes em menor número no ar, em comparação com esporos bacterianos e fungos, devido ao fato de elas não sobreviverem por longo período no ar, a menos que a umidade relativa ou outros fatores sejam favoráveis ou, ainda, que essa célula esteja em alguma matriz protetora.

2. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Ar

A qualidade microbiológica do ar pode ser determinada por uma variedade de métodos, incluindo sedimentação em placas, impressão em superfície de ágar, filtração, centrifugação, precipitação eletrostática, colisão em líquido e precipitação térmica. Cada método possui suas vantagens e limitações, e a seleção de um método adequado ao que se pretende é importante para um bom monitoramento da qualidade do ar.

Sedimentação e impressão em ágar são os métodos mais freqüentemente usados e permitem a utilização de meios seletivos ou não para determinação de microrganismos presentes nos bioaerossóis.

2.1. Sedimentação em Placas

O método de sedimentação em placas é baseado na deposição de partículas transportadas pelo ar na superfície de meio de cultura e é influenciado pela dimensão dessas, contendo células viáveis. Aquelas que apresentam dimensões de aproximadamente 10 μm depositam-se mais facilmente do que partículas menores; no entanto, dependendo da velocidade e direção de correntes de ar, a deposição de partículas menores pode ser facilitada.

Geralmente, são realizadas as análises de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras. No entanto, outros grupos microbianos incluindo microrganismos patogênicos podem ser determinados. Qualquer que seja a análise, fundamenta-se em metodologias reconhecidas, como aquelas propostas pela APHA (1992).

As contagens microbianas no ar dos ambientes são determinadas pela fórmula:

$$\text{Partículas viáveis} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}^{-1} = \frac{\text{UFC} \cdot 10080^*}{(\pi \cdot r^2) \cdot t}$$

t= tempo de sedimentação em minutos;
r= raio da placa de Petri em cm;
UFC= nº de colônias na placa, após incubação;
**minutos em uma semana.*

No *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*/APHA (1985), as metodologias para avaliação do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos foram classificadas em quatro categorias: classes O, A1, ou A2; classe B; classe C; e classe D (Quadro 1). Não há um método classe A para testar a qualidade microbiológica do ar, e método de sedimentação em placas é tido como classe D, recomendando-se 15 min de exposição para placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meios de cultura adequados à determinação do microrganismo desejado.

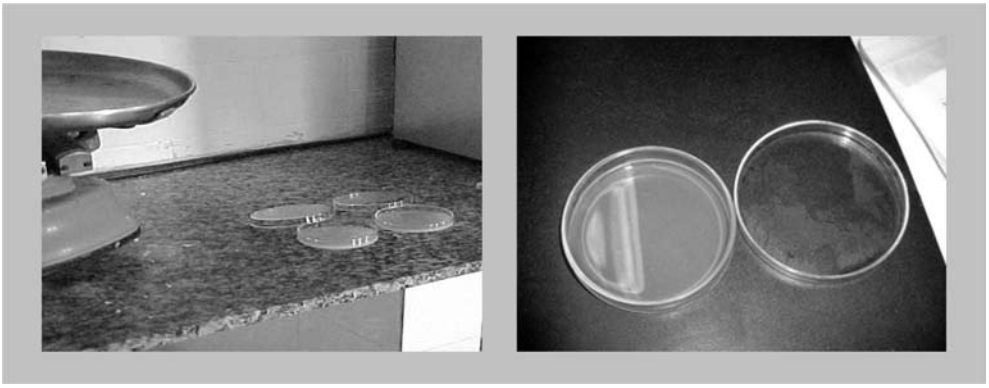


Figura 1 - Técnica da sedimentação simples.

Quadro 1 - Classificação de metodologias de análise do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos

Classes	Descrição
O, A1 ou A2	Metodologias-padrão
B	Métodos testados e usados com sucesso em certas situações de pesquisas
C	Métodos não testados
D	Métodos que eram classes O, A1 ou A2, porém substituídos por métodos mais eficientes

Fonte: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (APHA, 1985).

2.2. Impressão em Ágar

Os amostradores de ar por sucção consistem em imprimir certo volume de ar em meio seletivo ou não, podendo ser de um ou múltiplos estágios, ou seja, contendo uma ou uma série de placas de metal, com orifícios igualmente dispostos e sucessivamente menores. Essa série de placas permite que partículas menores sejam coletadas nos estágios finais, devido a um aumento na velocidade do ar, fornecendo também a informação da distribuição das partículas de acordo com as suas dimensões.

Com um fluxo constante de 100 L de ar por minuto, o MAS 100 *Air Sampler-Merck* é um amostrador com capacidade de coletar e recuperar partículas viáveis acima de 1 μm (MERCK, 2001ab). Com base no princípio do amostrador de ar de Andersen (1958), ele coleta e imprime o ar em uma superfície de meio de cultura, logo após atravessar uma placa de metal com 400 poros, igualmente distribuídos, à velocidade de 0,45 $m.s^{-1}$, para aspiração horizontal.

Para as determinações dos grupos de microrganismos analisados são utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20 mL dos respectivos meios de cultura, conforme recomendações da APHA (1992). Durante a coleta de amostras, a tampa do amostrador pré-autoclavada (121 °C por 15 min) é sanitizada, usando-se algodão umidecido com álcool etílico 70 %, no intervalo de cada amostragem. Após cada coleta, as placas removidas do amostrador são tampadas, invertidas e incubadas sob condições ideais para cada determinação, sendo 30 °C/3-5 dias para fungos filamentosos e leveduras e 35 °C/48 h para mesófilos aeróbios (APHA, 1992). A contagem de UFC é corrigida por meio de uma tabela desenvolvida com base em probabilidade estatística:

$$Pr = N \times \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \cdots + \frac{1}{N-r+1} \right]$$

Pr = probabilidade estatística total de UFC ;
N = número total de poros da placa de metal (400); e
r = número de unidades formadoras de colônias.

Essa correção mostra que, quanto maior o número de partículas viáveis impressas na placa, menor a probabilidade de as próximas partículas passarem em orifícios vazios, subestimando a contagem. Dessa forma, o número de UFC por volume de ar em m^3 pôde ser determinado:

$$UFC.m^{-3} = \frac{Pr}{V}$$

V = volume de ar coletado em m^3.

Compensando fatores como influência do fluxo de ar, volume de ágar e dimensão da placa, o amostrador fornece resultados corretos e precisos, sendo classificado pela 16ª edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* como método Classe B.

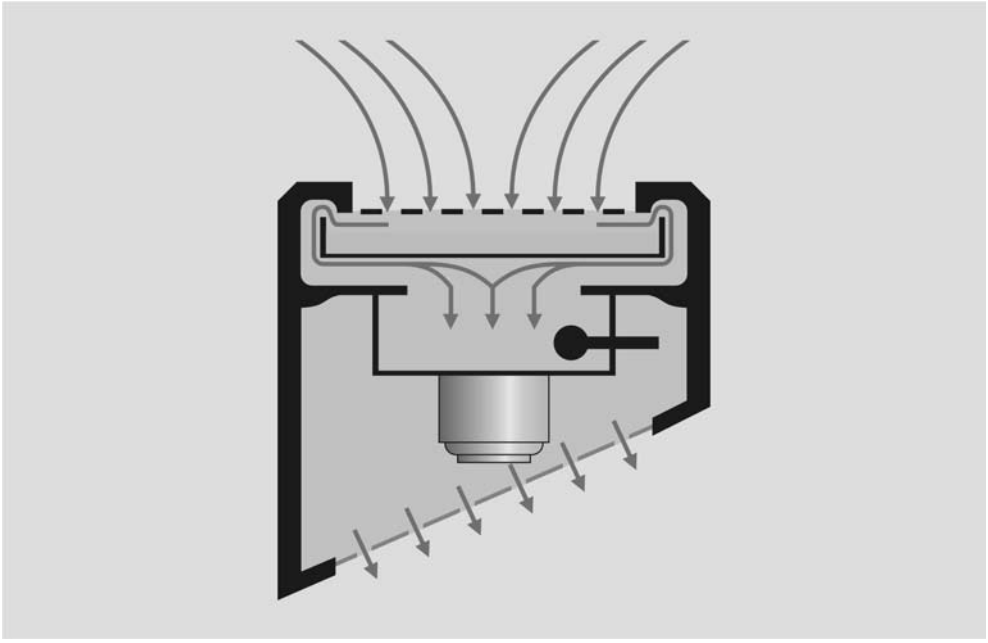


Figura 2 - Princípio de funcionamento do amostrador de ar.

A eficiência de qualquer avaliação microbiológica do ar varia de acordo com o amostrador utilizado e a natureza dos aerossóis a serem amostrados. As recomendações para a qualidade microbiológica do ar podem ser estabelecidas de acordo com os grupos de microrganismos pesquisados por volume de ar ou deposição de partículas viáveis em área e tempo definidos e níveis críticos de contaminação para cada alimento em questão ou tipo de indústria de alimentos. As recomendações propostas pela NASA (Quadro 2) e adotadas pela APHA também podem ser usadas como referências para se estabelecer uma especificação própria para determinadas situações na indústria de alimentos.

Figura 3 - MAS 100 *Air Sampler/Merck.*

Quadro 2 - Recomendação da APHA (*American Public Health Association*) para o controle microbiológico do ar ambiental

Teste	Classes*		
	Alta	Média	Baixa
Número máximo de partículas viáveis. m^{-3} de ar	3,5	7,6	88,0
Número médio de partículas viáveis. cm^{-2}. $semana^{-1}$	1,2	6,5	32,0

*Recomendações da NASA *National Aeronautics and Space Administration* para o controle microbiológico de ar de ambientes.
Fonte: Adaptado de Evancho et al., 2001.

A partir de um estudo realizado em ambientes de embalagem de produtos lácteos, foi proposta outra recomendação para a qualidade microbiológica do ar de acordo com os seus níveis máximos de microrganismos, quanto ao tempo de exposição do produto (Quadro 3). Esses níveis máximos foram estabelecidos de forma a garantir que a contaminação resultante em 1 L de produto não provoque alterações indesejáveis. Esses níveis são dados para recipientes de várias dimensões de abertura e diferentes períodos de exposição ao ar.

Quadro 3 - Níveis máximos aceitáveis de microrganismos por m³ de ar, em virtude do tempo de exposição e da dimensão da abertura do recipiente de embalagem

	Tempo de exposição (s)							
Abertura (cm^2)	1	2	3	4	5	10	15	20
5	785	390	262	197	157	79	52	40
10	392	161	130	100	78	38	25	20
15	260	130	86	65	52	25	17	13
20	195	98	65	50	40	20	13	10
50	78	40	25	20	16	8	6	4
100	40	20	13	10	8	4	3	1

Um programa de monitoramento da qualidade do ar pode ser aplicado em plantas de processamento de laticínios, com a finalidade de controlar patógenos e aumentar a vida de prateleira dos produtos. Um acréscimo de sete dias na vida de prateleira de leite pasteurizado foi obtido com o uso de um sistema asséptico de embalagem que elimina o risco de contaminação por microrganismos transportados pelo ar.

A seguir são descritos alguns trabalhos que envolvem avaliações microbiológicas do ar em estabelecimentos produtores de alimentos.

3. Resultados de Avaliação da Qualidade Microbiológica do Ar de Ambientes de Processamento

3.1. Em uma Unidade de Alimentação e Nutrição

É fundamental proceder-se à avaliação das condições microbiológicas em Unidade de Alimentação e Nutrição (UANs), por meio de um monitoramento correto, com especificações ou recomendações apropriadas, determinando-se se o nível de higiene é aceitável, efetuando-se as correções, se necessárias, e mantendo-se o processo sob controle.

Em um dos trabalhos (SILVA, 1996) foram avaliadas as condições microbiológicas de ar de ambientes de processamentos em 12 Unidades de Alimentação e Nutrição (UANs) das Zonas da Mata e Metalúrgica de Minas Gerais, com capacidade para produzir entre 1.000 e 4.000 refeições/dia, comparando-as com as recomendações da *American Public Health Association* (APHA). A partir de análises dos dados, foram sugeridas especificações microbiológicas, com o propósito de fornecer subsídios para a melhoria da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos produzidos nessas UANs.

Um total de 63 ambientes selecionados pelos responsáveis técnicos pelas UANs foi avaliado pela técnica de sedimentação simples. Em razão das exigências de qualidade microbiológica dos ambientes, as UANs foram enquadradas na classe menos exigente, conforme recomendação da APHA.

Verificou-se, em relação aos mesófilos aeróbios, que apenas 18,5 % dos ambientes avaliados encontravam-se corretamente higienizados. Usando essa mesma recomendação para fungos filamentosos e leveduras, constatou-se que 32,28 % dos ambientes apresentavam condições satisfatórias de higiene (Figura 4).

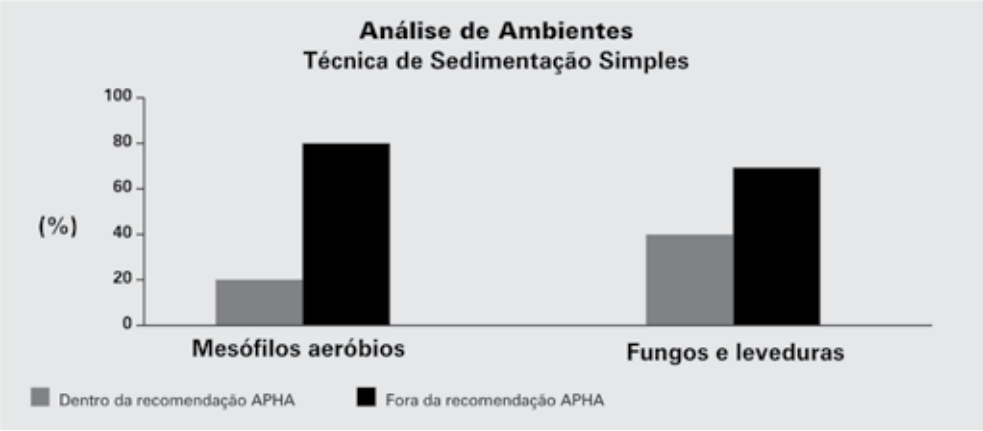


Figura 4 - Porcentuais de ambientes com contagens de mesófilos aeróbios e de fungos e leveduras dentro da recomendação da APHA (até 30 UFC.cm^{-2}.semana^{-1}).

Muitas vezes, essa recomendação americana é considerada rígida pelos restaurantes brasileiros. As recomendações da APHA ou da OMS (Organização Mundial de Saúde) devem ser utilizadas apenas como referência, pois é de se esperar que, dentre as UANs nacionais, encontram-se aquelas que trabalham dentro de condições preconizadas pela APHA e também muitas outras, provavelmente a maioria, que não atendem às recomendações adotadas nos Estados Unidos.

Um procedimento de higienização pode ser considerado inadequado ou aceitável se o número de bactérias de interesse ultrapassar ou não determinado limite. O símbolo "m" é usado para representar esse limite, como uma linha que divide um processo considerado bom e outro de qualidade insatisfatória, e os valores de "m" devem ser consistentes com as Boas Práticas de Processamento (BPP) e determinados de acordo com a importância atribuída ao microrganismo. Já o símbolo "M" é igual ao menor valor capaz de causar prejuízos à saúde ou problemas relacionados à higiene na indústria de alimentos.

Existem diferentes sugestões para se determinar um valor para "m". Uma delas se baseia em levantamento de dados, em um universo representativo, em

que a média e o desvio-padrão são estimados. Para evitar a tendenciosidade, esses levantamentos devem ser feitos sob amostragem estatística, propondo-se valores de m= X + 2s, em que X é a média aritmética dos logaritmos das contagens e s é o desvio-padrão desses valores.

No trabalho mencionado anteriormente, três metodologias para a determinação de especificações para ambientes (valor "m") foram testadas. Na primeira, todos os restaurantes que atendiam às BPP foram incluídos na análise estatística dos dados. Uma segunda estratégia incluiu apenas os restaurantes que atendiam às BPP, em que nenhum ambiente obtivesse contagens elevadas, ou seja, acima da média mais o intervalo de confiança de 5%. A terceira estratégia agrupou os estabelecimentos que atendiam às BPP e excluiu da análise apenas os ambientes cujas contagens eram elevadas.

Para a classificação dos restaurantes como estabelecimentos que operavam dentro das BPP, foram aplicados questionários em que se avaliaram os seguintes fatores: controle de procedência e recebimento da matéria-prima; condições de processamentos, sendo considerados a qualidade da água, equipamentos, pontos críticos de controle do processo, procedimentos de limpeza e sanitização, condições da estrutura física e, ainda, processo de manipulação de alimentos nos estabelecimentos avaliados.

Nesse critério de avaliação dos restaurantes quanto às BPF, foi estabelecida uma tabela de pontuação para as respostas negativas e positivas dos questionários, sob o julgamento de um especialista da área. Ao atingir total de 105 pontos em 150 (pontuação máxima), ou seja, um porcentual de 70 %, o restaurante seria classificado dentro das BPF. Esse porcentual foi estabelecido considerando-se simulações feitas ao se usar questionários que obtiveram valores iguais ou superiores a 70 % em restaurantes comprovadamente operando em Boas Práticas de Processamento.

Para a determinação do valor "m", a terceira estratégia foi escolhida, pois as outras metodologias forneciam valores irreais, muito baixos ou elevados, para serem tidos como especificações microbiológicas recomendadas. Os valores de "m", expressos em UFC.cm^{-2}.semana^{-1}, determinados para os ambientes refrigerados, em relação a microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras, foram, respectivamente, 80 e 50 e para os não-refrigerados, 250 e 100 (SILVA, 1996).

Esses valores foram utilizados para avaliar e classificar as condições de higiene das 12 UANs avaliadas. Quanto aos mesófilos aeróbios, constatou-se que 32,3 % dos ambientes refrigerados e 24,3 % dos não-refrigerados apresentaram contagens acima dos valores de "m" sugeridos, o que significa condições higiênicas insatisfatórias.

Uma interpretação das contagens encontradas em relação ao valor "m" foi proposta por Silva (1996), conforme Quadro 5.

Quadro 4 - Valores de "m" propostos para ar de ambientes em unidade de alimentação e nutrição, usando-se o método da sedimentação em placas

Grupo microbiano ($UFC.cm^{-2}.semana^{-1}$)	Ambientes refrigerados	Ambientes não-refrigerados
Mesófilos aeróbios	80	250
Fungos filamentosos e leveduras	50	100

Quadro 5 - Interpretação dos resultados das contagens de mesófilos aeróbios no ar de ambientes de processamento de alimentos

Interpretação	Condições
De acordo com as especificações	Contagens iguais ou inferiores a "m"
Em desacordo com as especificações	Contagens acima dos valores de "m"
Condições higiênicas insatisfatórias	Contagens acima de "m" e num limite máximo de 10 vezes "m"
Impróprio para processamento de alimentos	Contagens acima de 10 vezes "m"

Com base na classificação proposta, observaram-se ainda, nas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, situações impróprias ao processamento de alimentos, estando nessas condições 0,74 % dos ambientes não-refrigerados das UANs avaliadas

Os valores de "m" encontrados por Silva et al. (2003) servem como especificações para os restaurantes industriais situados nas regiões das Zonas da Mata e Metalúrgica mineiras, sendo também úteis como referências ao controle de qualidade das UANs que desejam produzir alimentos que, além de apresentar qualidades nutricionais e sensoriais, tenham boas condições higiênico-sanitárias, não oferecendo, portanto, riscos à saúde do consumidor.

3.2. Em uma Indústria de Processamento de Leite

3.2.1. Contagem Microbiana pelas Técnicas da Sedimentação em Placas e Impressão em Ágar

A eficiência de qualquer forma de tratamento do ar, para melhorar sua qualidade microbiológica, segundo Wilson (1958), pode ser avaliada por meio da taxa de morte da população de microrganismos transportados pelo ar, sob a influência de um agente germicida e também pela medida do porcentual de redução de microrganismos viáveis no ar após a aplicação de determinado tratamento antimicrobiano.

A desinfecção química do ar de ambientes requer o emprego de um germicida que tenha fácil acesso aos bioaerossóis; por essa razão, sanitizantes na forma de gás ou névoa fina são os mais efetivos. As concentrações recomendadas de agentes químicos sanitizantes para desinfecção do ar em ambientes de processamento de

alimentos são variadas, mas com limites máximos de uso preconizados pelos fabricantes (Quadro 6). Esses limites, segundo os próprios fabricantes, ainda carecem de base científica sólida, tendo sido realizados apenas alguns estudos internos e empíricos de sua eficácia.

Quadro 6 - Concentrações para uso, sugeridas para alguns agentes químicos para desinfecção do ar de ambientes na indústria de alimentos

Agentes químicos sanitizantes	Concentrações de uso
Ácido peracético	Entre 45 e 75 $mg.L^{-1}$
Quaternário de amônio	Entre 700 e 1.200 $mg.L^{-1}$
Digluconato de clorhexidina	Entre 1.000 e 2.000 $mg.L^{-1}$

Fonte: Toshio, 2001.

Em um trabalho realizado em uma indústria de laticínios de porte médio, avaliou-se a microbiota do ar de seis ambientes de processamento: i) recepção de leite cru, ii) embalagem de leite, iii) pasteurização de leite, iv) processamento de queijo, v) processamento de iogurte e vi) processamento de doce de leite e manteiga. Foram utilizadas as técnicas da impressão em ágar e da sedimentação em placas. Avaliou-se, ainda, a eficiência de soluções diluídas de sanitizantes à base de digluconato de clorohexidina, de ácido peracético e de quaternário de amônia, pulverizadas no ar a uma pressão de 9 $kgf.cm^{-2}$, à temperatura entre 20 °C e 25 °C . Simultaneamente à coleta de amostras, também foram medidas a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar de cada local de amostragem.

Em cada ambiente de processamento, foram determinadas as contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, de coliformes totais, de fungos filamentosos e leveduras e de *Staphylococcus* spp., por meio de *Plate Count Agar (*PCA), *Violet Red Bile Agar (*VRBA), *Potato Dextrose Agar* (PDA) e *Baird–Parker Agar (*BPA), conforme metodologias propostas pela APHA.

No Quadro 7, são mostradas as faixas de contagem, as médias e os desvios-padrão dos números de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, presentes no ar de seis ambientes de processamento da indústria de laticínios, avaliados pela técnica de impressão em ágar.

Os resultados da determinação de microrganismos mesófilos aeróbios foram comparados com a recomendação da APHA, para contagem total em placas. Não havendo recomendação específica da APHA para o número máximo sugerido de fungos filamentosos e leveduras, tomou-se como base para comparação o mesmo valor recomendado para contagem total em placas. Observou-se que as contagens médias em todos os ambientes estiveram acima de 90 $UFC.m^3$ de ar, ou seja, superior à recomendada pela APHA. No entanto, deve-se salientar que recomendações menos

exigentes para ambientes de processamento na indústria de laticínios são encontradas na literatura (KANG; FRANK, 1989). Esses autores sugeriram de 180 a 360 UFC. m^{-3} de ar para microrganismos mesófilos aeróbios e de 70 a 430 UFC.m^{-3} para fungos filamentosos e leveduras, dependendo do ambiente de processamento. Outros autores recomendaram contagens menores que 200 UFC.m^{-3} para salas de embalagem de produtos lácteos e menores que 1.400 UFC.m^{-3} de ar para plantas de processamento de sorvete. Neste trabalho, realizado em laticínios, adotaram-se para comparação os valores recomendados pela APHA.

Quadro 7 - Faixa de contagem, médias e desvio-padrão de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, em UFC.m^{-3}, no ar de ambientes de processamento de uma planta de laticínios, pela técnica de impressão em ágar

Ambientes	Fungos filamentosos e leveduras (UFC.m^{-3})		Microrganismos mesófilos aeróbios (UFC.m^{-3})	
	Faixa de contagem	X ± s	Faixa de contagem	X ± s
Pasteurização de leite	70-160	111,1 ± 6,9	110-600	313,3 ± 6,6
Plataforma de recepção	90-260	176,7 ± 49,8	20-380	161,1 ± 98,0
Processamento de doce e manteiga	60-1310	410,0 ± 490,8	10-440	135,6 ± 119,3
Processamento de queijos	90-610	342,2 ± 39,1	100-920	381,1 ± 289,8
Processamento de iogurte	100-940	294,4 ± 238,3	100-320	212,2 ± 47,6
Embalagem de leite	100-280	184,4 ± 38,6	60-170	100,0 ± 47,6

As contagens dos diferentes grupos microbianos variaram entre 10 e 1310 UFC.m^{-3} de ar nos ambientes de processamento, que podem originar problemas de qualidade nos diversos produtos lácteos. Sullivan (1979) constatou que 40 % da variação da vida de prateleira de queijo cottage pode ser devida à contaminação do ar. O predomínio da contaminação de iogurte por coliformes na superfície do produto envasado em potes plásticos evidenciou que esses microrganismos foram transportados pelo ar, contaminando o produto. A qualidade de um produto lácteo à base de açúcar, ovo e farinha de trigo, esterilizado pelo processo UAT, também foi afetada pela contaminação do ambiente de processamento. A contaminação intencional do ar em torno da máquina de embalagem (procedimento não-asséptico) com pulverização de três esporos de *Bacillus* spp. por litro de ar causou alteração em 24 % das amostras desse produto; no entanto, apenas 2,5 % das amostras apresentaram alteração quando pulverizados 210 esporos por litro de ar ao redor de uma máquina de empacotamento asséptico.

Vários fatores podem ter contribuído para a contaminação do ar dos ambientes de processamento, por exemplo a localização do laticínio e a falta de maior controle das possíveis fontes de contaminação dentro da indústria. As áreas críticas, onde os produtos e as superfícies que entram em contato com os alimentos estão expostos ao ar, devem estar fisicamente separadas de áreas não-críticas, como salas de administração e estocagem de leite cru. Outros detalhes que deveriam ser observados são os sistemas de ventilação e exaustão, o próprio desenho e a estrutura da planta e as práticas de fabricação.

Os números de coliformes totais e de *Staphylococcus* spp. variaram de <1,0 a 1,7 UFC.m^{-3} e < 1,0 a 4,3 UFC.m^{-3}, respectivamente. Essas contagens são consideradas inferiores àquelas obtidas por Sullivan, na faixa de 0,1-1,0 UFC/10 L de ar, o que corresponde a 10,0 e 100,0 UFC.m^{-3}. Os baixos números observados tanto neste experimento quanto no de Sullivan, em relação aos obtidos na determinação de outros grupos microbianos, evidenciam que esses microrganismos parecem não sobreviver muito bem em aerossóis. Essas contagens baixas podem, ainda, ser devidas à associação do uso de meios seletivos e ao estado de estresse dos microrganismos em aerossóis, que, segundo Sveum et al. (1992), podem dificultar o crescimento e a determinação de microrganismos.

No Quadro 8, encontram-se as faixas de contagem, médias e desvios-padrão dos números de fungos filamentosos e leveduras e microrganismos mesófilos aeróbios, expressos em UFC.cm^{-2}.semana^{-1}, obtidos pela técnica de sedimentação, nos ambientes de processamento da indústria de laticínios. Dois ambientes atenderam à recomendação da APHA de 30 UFC.cm^{-2}.semana^{-1}: a sala de processamento de leite pasteurizado para fungos filamentosos e leveduras e a sala de embalagem de leite pasteurizado para microrganismos mesófilos aeróbios.

No Quadro 9, são apresentadas as análises de variância dos números de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, expressos em UFC.cm^{-2}.semana^{-1}, nos ambientes de processamento. Constatou-se que não houve diferença ($p \geq 0,05$), com relação a ambos os grupos microbianos avaliados, entre os diferentes ambientes.

A técnica de sedimentação não se mostrou capaz de recuperar, de forma considerável, células viáveis de coliformes totais e *Staphylococcus* spp. do ar, tendo em vista que as contagens, quase que em sua totalidade, foram menores que 10 UFC. cm^{-2}.semana^{-1} em todos os ambientes avaliados.

Quanto à distribuição da microbiota do ar, houve a predominância de fungos filamentosos e leveduras pela técnica de impressão em ágar e de microrganismos mesófilos aeróbios pela técnica de sedimentação, o que pode ser explicado pelo comportamento aerodinâmico diferenciado dos microrganismos.

Quadro 8 - Faixas de contagem, médias e desvios-padrão de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, obtidos pela técnica de sedimentação

Ambientes	Fungos filamentosos e leveduras (UFC.cm^{-2}.semana^{-1})		Microrganismos mesófilos aeróbios (UFC.cm^{-2}.semana^{-1})	
	Faixa de contagem	X ± s	Faixa de contagem	X ± s
Pasteurização de leite	10-42	21,7 ± 6,7	11-89	64,9 ± 11,6
Plataforma de recepção	21-52	31,4 ± 4,0	10-73	73,6 ± 55,6
Processamento de doce e manteiga	10-87	39,6 ± 28,0	18-95	46,9 ± 53,6
Processamento de queijos	15-79	45,2 ± 5,4	15-84	37,6 ± 8,3
Processamento de iogurte	10-97	45,5 ± 30,2	10-79	54,0 ± 58,5
Embalagem de leite	13-42	36,1 ± 6,6	10-50	26,4 ± 58,5

Quadro 9 - Resumo da análise de variância do número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, pela técnica de sedimentação, expresso em UFC.cm^{-2}.semana^{-1}, nos ambientes de processamento da indústria de laticínios

F.V	G.L	Quadrados médios	
		Microrganismos mesófilos aeróbios	Fungos filamentosos e leveduras
Ambiente	5	$5{,}9112 \times 10^{10}$ n.s.	$2{,}7636 \times 10^{10}$ n.s.
Resíduo	12	$9{,}8335 \times 10^{10}$	$3{,}0468 \times 10^{10}$
C.V.		64,61	49,26

N.s. Não-significativo a 5% de probabilidade.

Apesar de haver dados na literatura sobre a influência da temperatura no aumento da microbiota do ar, neste experimento parece que não houve essa relação entre as contagens obtidas, em razão da variabilidade das condições de análise. A influência da umidade relativa nas contagens obtidas neste trabalho pode ser explicada pela maior facilidade de as células microbianas permanecerem viáveis em aerossóis na presença de maiores teores de umidade.

As técnicas de análise foram comparadas com base na relação de 1:3 estabelecida entre as recomendações da APHA de 30 UFC.cm^{-2}.semana^{-1} e de 90 UFC.m^{-3} de ar. Pela técnica da impressão em ágar, houve contagens que variaram de 5 a 10 e de 2 a 10 vezes mais, respectivamente, que as obtidas por sedimentação, evidenciando-se a maior capacidade da técnica de impressão em ágar de determinar microrganismos do ar.

Essa menor capacidade da técnica de sedimentação em recuperar microrganismos do ar pode ser explicada pela necessidade de certo tempo de exposição, para deposição das partículas nas placas de Petri. Da mesma forma, a dimensão dos esporos também influencia a deposição. Diversos gêneros de fungo foram listados e classificados em três categorias, quanto às suas dimensões: esporos maiores (*Alternaria, Stemphilium, Epicoccum, Nigrospora, Diplospora, Monotospora* e *Sepedonium*); esporos intermediários (*M. sitophilia, Geotrichum, Cândida, Pullularia, Saccharomyces, Aspergillus, Hormodendrum* e *Penicillium*); e esporos menores (*Ustilago, Rhodotorula, Rhizopus, Oospora, Gliocladium, Paecilomyces, Hemispora* e *Streptocyces*). Analisados pelas técnicas de sedimentação simples e impressão em ágar, para esporos maiores, intermediários e menores, as relações encontradas entre as duas técnicas foram de aproximadamente 1:5, 1:14; e 1:19, respectivamente. Portanto, quanto menor a dimensão do esporo, mais visível a diferença entre as duas técnicas e a superioridade da técnica de impressão em ágar.

O tempo de análise requerido também é um fator importante para a comparação das técnicas, pois a sedimentação exige tempo maior de exposição das placas de Petri ao ar ambiente. Período longo de exposição dessas placas pode resultar em ressecamento do meio de cultura, dificultando o crescimento das colônias e subestimando as contagens. Na técnica de impressão em ágar, embora o ar que entra no amostrador seja considerado seco, a umidade dentro do amostrador aumenta rapidamente, não permitindo o ressecamento do meio de cultura. Em um estudo, essa umidade do ar era de 23 % antes de entrar no amostrador e passou para 39 % dentro deste, ficando também evidenciado que a passagem do ar pelo amostrador, durante 1 h, não reduziu as contagens de *Serratia marcescens*.

3.2.2. Avaliação de Agentes Químicos Sanitizantes no Controle Microbiológico do Ar

A eficiência de agentes químicos sanitizantes pulverizados no ar foi avaliada, aplicando-se solução sanitizante no controle da microbiota do ar nas áreas de embalagem de leite pasteurizado; de processamentos de doce de leite e manteiga; e de queijo, previamente selecionadas, após o término do expediente. Um bico pulverizador ligado à linha de ar comprimido da própria indústria foi utilizado, com aplicação de uma fina névoa, com pressão de aproximadamente 9 $kgf.cm^{-2}$ (Figura 5).

Na proporção de 1.000 mL por 160 m^3 de ar, as soluções sanitizantes foram aplicadas nos ambientes de processamento de queijo (330 m^3 de ar), doce de leite e manteiga (330 m^3 de ar) e de embalagem de leite (80 m^3 de ar). Equipamentos de proteção, como luvas, máscaras de gás, óculos de proteção e gorros, foram utilizados para segurança e proteção do aplicador (Figura 5). O intervalo das aplicações com a mesma concentração foi de três dias e nas soluções com concentrações diferentes, de uma semana.

Figura 5 - Aplicação da solução sanitizante por pulverização no ar dos ambientes.

Para avaliação da eficiência dos sanitizantes, foram realizadas análises de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras presentes no ar. Neutralizantes para os sanitizantes aplicados e avaliados foram adicionados aos meios PCA e PDA, para inibir a interferência dos sanitizantes nas análises, de acordo com as recomendações usuais (Quadro 10).

Quadro 10 - Neutralizantes adicionados aos meios de cultura, ação e concentração de uso em meios sólidos ou líquidos

Neutralizante	Sanitizante	Concentração usada (%)
Tween 80	Digluconato de clorohexidina Quaternário de amônia	1,5
Lecitina	Digluconato de clorohexidina Quaternário de amônia	0,5
Tiossulfato de sódio	Ácido peracético	0,5

Esses grupos de microrganismos foram determinados em quatro tempos distintos: antes da aplicação, após 30 min, 12 e 24 h, pelas técnicas de sedimentação e impressão em ágar. Assim, após realizar a análise no "tempo zero" (T_0), a aplicação foi feita após o expediente, às 17 h, com término até as 17 h 30; o "tempo um" (T_1) foi analisado às 18 h, o "tempo dois" (T_2) às 5 h 30 do dia seguinte e, finalmente, "o tempo três" (T_3) às 17h 30 também do dia seguinte.

Em razão dos resultados e de informações da literatura, considerou-se neste trabalho que houve ação antimicrobiana do sanitizante quando a redução das contagens microbianas foi de pelo menos 15 % em duas das três aplicações do agente químico, 30 min após a pulverização ambiental. Considerou-se, ainda, que a solução sanitizante apresentou efeito residual quando ocorreram reduções de pelo menos 10 % nas contagens determinadas antes da pulverização, da primeira para a segunda aplicação e da segunda para a terceira aplicação. O uso de sanitizantes foi avaliado nos diferentes tempos de análise do ar dos ambientes: T_o, antes, e T_1, T_2 e T_3 respectivamente, 30 min, 12 e 24 h depois da pulverização.

Nas aplicações de digluconato de clorohexidina a 2.000 $mg.L^{-1}$ e de quaternário de amônia a 700 $mg.L^{-1}$, foi observada a ação antimicrobiana da solução sanitizante contra fungos filamentosos e leveduras. Contra microrganismos mesófilos aeróbios, foi constatada a ação antimicrobiana de ácido peracético a 45 $mg.L^{-1}$ (Quadro 11). Nas aplicações de digluconato de clorohexidina a 1.000 $mg.L^{-1}$, foi constatado efeito residual contra fungos filamentosos e leveduras. Constatou-se, também, efeito residual da aplicação de ácido peracético a 75 $mg.L^{-1}$, contra fungos filamentosos e leveduras (Quadro 12).

Quadro 11 - Log_{10} UFC.m^{-3} de fungos filamentosos e leveduras e mesófilos aeróbios antes da aplicação do sanitizante (T_0) e após 30 min de aplicação (T_1) e a porcentagem de diminuição (-) ou aumento (+) após a pulverização do sanitizante no ar de ambiente de processamento em um laticínio

Grupo microbiano	Sanitizante	Concentração $mg.L^{-1}$	Intervalo de aplicação (dias)		
			0 T0 - T1	3 T0 - T1	6 T0 - T1
Fungos e leveduras	Digluconato de clorexidina	1000	2,1 - 0,9 (-55,5)	1,4 1,2 (-12,5)	1.0 - 1,0 (0)
		2000	1,4 - 1,0 (-29,6)	1,6 - 1,1 (-28,75)	1,9 - 2,1 (+8,6)
	Ácido peracético	45	1,8 - 1,7 (-6,1)	1,6 - 1,8 (+10,7)	1,6 - 2,3 (+44,8)
		75	1,8 1,6 (-12,3)	1,6 - 1,4 (-10,6)	1,3 - 1,8 (+34,7)
	Quaternária de amônia	700	1,3 - 1,0 (-26,3)	1,3 - 0,7 (-43,1)	1,3 - 0,7 (-45,0)
		1200	1,0 - 1,0 (0)	1,6 - 1,5 (-6,9)	1,0- 1,1 (+6,4)
Mesófilos aeróbios	Digluconato de clorexidina	1000	1,9 1,8 (-5,1)	1,0 - 1,4 (+32,8)	1,9 - 1,5 (-19,1)
		2000	2,2 - 1,4 (-4,8)	2,1 - 2,0 (-2,44	2,2 - 2,0 (-9,4)
	Ácido peracético	45	1,6 - 2,0 (+24.9)	2,0 - 1,5 (-22,2)	2,2 - 1,5 (-29,8)
		75	1,6 - 2,2 (+29,6)	2,0 - 1,5 (-22,2)	1,7 - 1,8 (+5,8)
	Quaternária de amônia	700	1,4 - 0,3 (-79,5)	1,3 - 1,4 (+3,5)	1,2 - 1,1 (-4,4)
		1200	2,0 - 2,2 (+8,9)	2,1 - 1,9 (-5,2)	1,7 - 2,0 (+18,1)

Quadro 12 - Efeito residual de sanitizantes pulverizados no ar de ambientes de processamento de uma indústria de laticínios contra fungos filamentosos e leveduras e mesófilos aeróbios

Grupo microbiano	Sanitizante	Concentração mg.L^{-1}	Efeito residual	
			T_o^1-T_o^2 (%)	T_o^2-T_o^3 (%)
Fungos filamentosos e leveduras	Digluconato de clorohexidina	1000	2,1-1,4 (-32,1)	1,4-1,0 (-29,9)
		2000	1,4-1,6 (+12,7)	1,6-2,0 (+22,5)
	Ácido peracético	45	1,8-1,6 (-8,9)	1,6-1,6 (-2,8)
		75	1,8-1,6 (-13,5)	1,6-1,4 (-13,9)
	Quaternário de amônia	700	1,3-1,3 (-1,0)	1,3-1,3 (+3,5)
		1200	1,0-1,6 (-53,3)	1,3-1,3 (+3,5)
Mesófilos aeróbios	Digluconato de clorohexidina	1000	1,9-1,0 (-44,5)	1,1-1,9 (+77,9)
		2000	2,2-2,0 (-9,7)	2,0-2,2 (+9,3)
	Ácido peracético	45	1,6-2,0 (+23,8)	2,0-2,2 (+12,5)
		75	1,7-1,4 (-19,1)	1,3-1,7 (+25,2)
	Quaternário de amônia	700	1,4-1,3 (-11,3)	1,3-1,2 (-9,6)
		1200	2,0-2,1 (+3,9)	2,1-1,7 (-19,7)

$T0^1$ = número inicial na primeira pulverização
$T0^2$ = número inicial na segunda pulverização
$T0^3$ = número inicial na terceira pulverização

Em relação aos fungos filamentosos e leveduras, as soluções de digluconato de clorohexidina a 1.000 mg.L^{-1} e de ácido peracético a 75 mg.L^{-1} e em relação aos microrganismos mesófilos aeróbios, as soluções de digluconato de clorohexidina a 2.000 mg.L^{-1} e de quaternário de amônia a 700 mg.L^{-1} apresentaram tendência de redução nas contagens de 30 min após as aplicações, embora não atendam ao critério adotado para considerá-las como de ação antimicrobiana. A solução de quaternário de amônia a 700 mg.L^{-1} para microrganismos mesófilos aeróbios teve também tendência ao efeito residual, com reduções próximas a 10 % nas contagens.

Em pesquisa realizada em uma indústria de alimentos, a pulverização, duas vezes por semana, do ar de ambientes de processamento com p-hidroxifenilsalicilamida para controle da contaminação por fungos apresentou reduções de 20-25 % na contagem de esporos de fungos do ar após algumas semanas de tratamento. Outra pesquisa também mostrou reduções similares quando se utilizou o mesmo agente químico, em indústrias de laticínios com contagens iniciais de fungos de 2.000 UFC.m^{-3} de ar. Após tratamento com 1,5 g.m^{-3} de p-hidroxifenilsalicilamida e tratamento de manutenção

com 1,0 g.m^{-3} de ar duas semanas depois, houve redução de 15 % nas contagens; após mais cinco tratamentos, a redução passou para 23-25 %. Nessa indústria de laticínios, a contaminação da manteiga que vinha ocorrendo em torno de 1.200 esporos de fungos por grama foi completamente controlada; reduções essas compatíveis com as encontradas no experimento ora citado.

As contagens de 12 e 24 h após a aplicação das soluções sanitizantes (T_2 e T_3) apresentaram números elevados em relação aos outros tempos de análise, uma explicação para essas maiores contagens seria a variabilidade das condições de análise, que nem sempre puderam ser controladas nos ambientes, principalmente nesses tempos.

Com base nos resultados deste estudo, sugere-se a avaliação, pela técnica da impressão em ágar, da aplicação de sanitizantes por períodos mais longos, fazendo-se o rodízio de agentes químicos e realizando, ainda, a associação da pulverização desses agentes com o controle de fontes na indústria que possam contribuir para a contaminação do ar.

3.3. Em uma Indústria de Produtos Cárneos

3.3.1. Considerações Gerais

As amostras para avaliação da qualidade microbiológica do ar foram coletadas em oito ambientes distintos de uma indústria de processamento de carnes: setor de cozimento, setor de embutimento de lingüiça, setor de embutimento, setor de embalagem, sala do "cutter", setor de preparo de massas, setor de produtos especiais e sala de pesagem.

Os resultados obtidos pelas técnicas de sedimentação simples e de impressão em ágar foram comparados usando-se a relação na recomendação da APHA (1992): de 3 UFC da técnica de impressão em ágar, para 1 UFC da técnica de sedimentação simples, e, com os resultados transformados, as duas técnicas foram comparadas.

3.3.2. Avaliação Microbiológica

Em relação ao ar dos ambientes, somente 12,5 % encontravam-se dentro das recomendações para mesófilos aeróbios e 33,3 % para fungos filamentosos e leveduras, pela técnica da sedimentação simples.

Quadro 13 - Mesófilos aeróbios (UFC.cm^{-2}.semana^{-1}) no ar de ambientes de processamento em uma indústria de cárneos

Repetições	A	B	C	D	E	F	G	H
01	11	1056	660	58	1056	338	1050	106
02	10	1056	116	458	380	386	460	613
03	58	930	127	238	85	69	16	158

A. Câmara 4; setor de cozimento; B: embutimento de lingüiça; C: setor de embutimento
D: setor de embalagem; E: sala do cutter F: preparo de massa G; produtos especiais; e H: sala de pesagem

Quadro 14 - Contagens de fungos filamentosos e leveduras (UFC.cm^{-2}.semana^{-1}) em ambientes de uma indústria de produtos cárneos

Repetições	A	B	C	D	E	F	G	H
01	16	2113	312	30	21	74	1278	10
02	21	491	111	121	30	37	137	48
03	11	327	111	42	63	16	58	90

A. câmara 4; setor de cozimento; B: embutimento de lingüiça; C: setor de embutimento D: setor de embalagem; E: sala do cutter; F: preparo de massa G; produtos especiais; e H: sala de pesagem

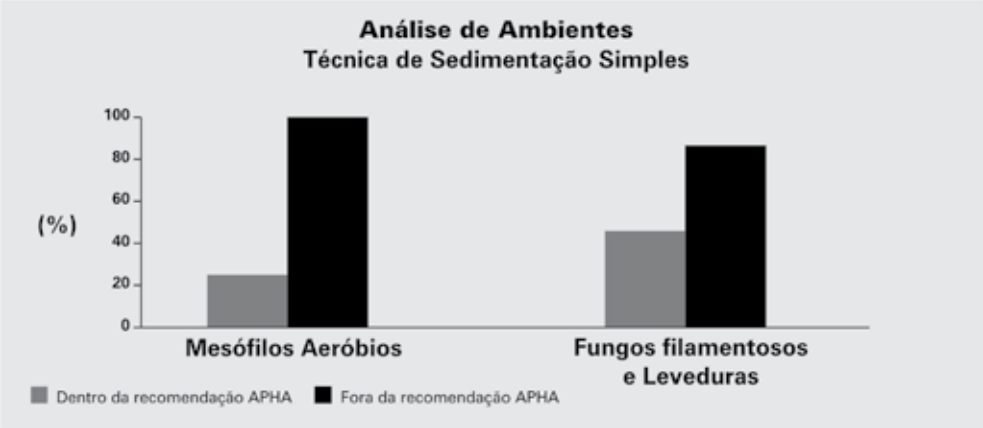


Figura 5 - Porcentagem de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras dentro e fora do padrão proposto pela APHA, por meio da técnica de sedimentação simples.

3.3.3. Técnica de Impressão em Ágar

Pela técnica de impressão em ágar, 33 % dos ambientes não atenderam às recomendações para a contagem de mesófilos aeróbios e 12,5 % para fungos filamentosos e leveduras.

Quadro 15 - Mesófilos aeróbios (UFC.m^{-3}) no ar de ambientes de processamento em uma indústria de cárneos

Repetições	A	B	C	D	E	F	G	H
01	35	110	285	175	2000	690	90	620
02	05	165	255	85	805	775	115	55
03	10	665	275	830	505	310	65	35

A. câmara 4; setor de cozimento; B: embutimento de lingüiça; C: setor de embutimento
D: setor de embalagem; E: sala do cutter F: preparo de massa G; produtos especiais; e H: sala de pesagem

Quadro 16 - Contagens de fungos filamentosos e leveduras, expressos em UFC.m^{-3}

Repetições	A	B	C	D	E	F	G	H
01	20	275	105	185	305	70	555	1050
02	135	735	215	690	195	420	315	430
03	70	490	875	415	1095	165	210	115

A. câmara 4; setor de cozimento; B: embutimento de lingüiça; C: setor de embutimento
D: setor de embalagem; E: sala do cutter F: preparo de massa G; produtos especiais; e H: sala de pesagem

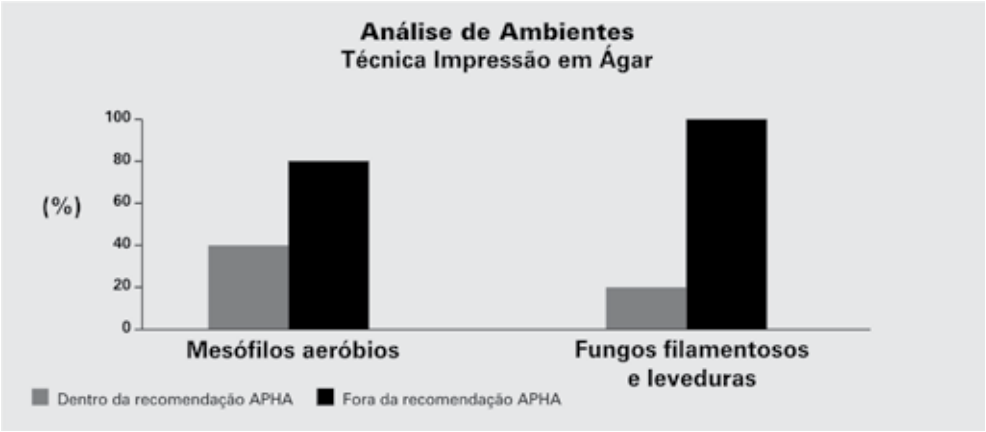


Figura 6 - Porcentagem de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras conforme recomendação proposta pela APHA, por meio da técnica de impressão em ágar.

3.3.4. Comparação entre as Técnicas de Sedimentação Simples e Impressão em Ágar

Os resultados das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras, obtidos através da técnica de impressão em ágar, expressa em UFC.m^{-3}, e da técnica de sedimentação simples, em UFC.cm^{-2}.semana^{-1}, foram utilizados a título de comparação.

De acordo com a APHA, um ambiente é considerado em condições higiênicas quando a contagem de mesófilos for no máximo de 30 UFC.cm^{-2}.semana^{-1}, para a técnica de sedimentação simples, e de 90 UFC.m^{-3}, para a técnica de impressão em ágar. Assim, existe a relação numérica de 1:3 (30:90) entre as contagens recomendadas para as técnicas de avaliação, usada na análise do resultado.

No Quadro 17 é mostrado que, para fungos filamentosos e leveduras, a técnica de impressão em ágar obteve contagens de 2 a 14 vezes mais que as contagens obtidas pela técnica de sedimentação simples, à exceção da sala de embutimento de lingüiça, na qual a contagem da técnica de sedimentação simples foi duas vezes maior que a contagem pela técnica de impressão em ágar.

Constatou-se, portanto, que a técnica de impressão em ágar recuperou do ar maior número de fungos filamentosos e leveduras, na maioria dos ambientes analisados. Cinco dos oito ambientes analisados apresentaram relações entre as contagens obtidas pelas duas técnicas maiores que 1:3.

As contagens de aeróbios mesófilos foram, no máximo, três vezes maiores quando se utilizou a técnica de impressão em ágar, não se confirmando essa tendência de maior recuperação dos microrganismos por essa técnica. Os resultados indicam que as informações fornecidas pelas duas técnicas devem ser usadas com cuidado e bom senso.

Quadro 17 - Diferentes grupos de microrganismos determinados pelas técnicas de impressão em ágar e sedimentação simples, dentro de cada ambiente de processamento na indústria de carnes

Grupos de microrganismos	Fungos filamentosos e leveduras		Relação	Mesófilos Aeróbios		Relação
Técnicas	Impressão em ágar. (UFC.m^{-3})	Sedimentação simples. (UFC.cm^{-2}.semana^{-1})		Impressão em ágar. (UFC.m^{-3})	Sedimentação simples. (UFC.cm^{-2}.semana^{-1})	
Setor de cozimento	75	16	1:5	17	26	1:1
Embutimento de lingüiça	500	977	2:1	655	1718	3:1
Setor de embutimento	399	178	1:2	272	301	1:1
Setor de embalagem	430	64	1:7	363	181	1:2
Sala do "cutter"	532	38	1:14	1103	859	1:1
Preparo de massa	218	42	1:5	592	264	1:2
Produtos especiais	360	491	1:1	90	863	10:1
Sala de pesagem	532	49	1:11	237	292	1:1

O ambiente de processamento apresentou contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras superiores ao recomendado pela APHA. Deve-se salientar, porém, que a coleta foi feita com a indústria em processamento, o que pode ter elevado o número de microrganismos presentes no ambiente analisado.

3.4. Em Microindústria de Processamento de Leite

Em trabalho realizado em parceria com um Serviço de Inspeção Municipal (SIM) foi avaliada a qualidade do ar de ambiente de processamento de cinco microindústrias que processavam de 100 a 600 L por dia, de um total de 24 inicialmente conveniadas ao SIM. Essas cinco microindústrias estavam se ajustando às exigências da legislação municipal 1252/89 e Decreto Municipal 3424/99, para posterior obtenção do selo de garantia de qualidade fornecido pelo SIM. O ar dos ambientes de processamento foi avaliado pela técnica da sedimentação simples em placas, pelas contagens de aeróbios mesófilos e fungos filamentosos e leveduras. Nesse caso, específico das microindústrias, considerou-se em boas condições microbiológicas o ar dos ambientes com valores abaixo de $1{,}0 \times 10^2$ UFC.cm^{-2}.semana^{-1}.

No Quadro 18, observa-se que os ambientes de todas as indústrias não se encontram em boas condições higiênicas para o processamento de alimentos. Nesse

caso, sugeriu-se o controle microbiológico dos ambientes analisados pelo uso de sanitização ambiental com um produto à base de cloro. Assim, pulverizaram-se duas vezes por semana uma solução de 100 mg.L^{-1} de cloro residual total, expresso em Cl_2, preparada a partir de hipoclorito de sódio 2 % de cloro residual total.

Quadro 18 - Porcentagem de análises de ambientes que apresentaram contagem de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras acima da recomendação (1,0x10^2 UFC.cm^{-2}.$semana^{-1}$)

Micro indústrias	Análises	
	Mesófilos aeróbios	Bolores e leveduras
A	100 %	78 %
B	33 %	17 %
C	100 %	78 %
D	100 %	83 %
E	92 %	58 %

Após 30 dias, ou seja, cerca de oito aplicações do sanitizante, o ar das áreas de processamento de uma microindústria selecionada apresentava contagens de mesófilos aeróbios e fungos filamentos e leveduras abaixo do recomendado, ou seja, abaixo de 1,0x10^2 UFC.cm^{-2}.$semana^{-1}$.

Mostrou-se, assim, que medidas simples e adaptadas às condições reais das microindústrias foram eficientes para minimizar o risco de produção de alimentos que venham causar problemas de intoxicações e infecções.

3.5. Em Câmaras Refrigeradas de uma Indústria de Laticínios

As amostras para a avaliação da qualidade microbiológica foram coletadas em três câmaras frias de uma indústria de laticínios destinadas à maturação de queijo, salga de queijo e de armazenamento de iogurte.

A qualidade microbiológica do ar das câmaras foi determinada pelos métodos de sedimentação simples e impressão em àgar, analisando-se mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras e psicrotróficos, conforme metodologias propostas pela APHA (1992).

Os resultados do Quadro 19 indicam que as contagens de mesófilos aeróbios nos ambientes avaliados encontravam-se abaixo da recomendação da APHA para as técnicas de impressão em ágar (90 UFC.m^{-3}) e de sedimentação simples (30 UFC.cm^{-2}.$semana^{-1}$), exceto na câmara de armazenamento de iogurte, que ultrapassou o recomendado para a técnica de impressão em ágar. As contagens de fungos filamentosos e leveduras encontravam-se acima das recomendações nos três ambientes avaliados por ambas as técnicas.

Quadro - 19. Contagens de microrganismos mesófilos aeróbios (MA) e fungos filamentosos e leveduras (FFL) determinadas pelas técnicas de sedimentação simples e impressão em ágar, em câmaras de refrigeração de um laticínio

Câmara de resfriamento	Sedimentação simples ($UFC.cm^{-2}.semana^{-1}$)		Impressão em ágar ($UFC.m^{-3}$)	
	MA	FFL	MA	FFL
Maturação de queijo	$1,1x10^{1}$	$4,810^{1}$	$5,7x10^{1}$	$1,3x10^{3}$
Salga de queijo	$1,5X10^{1}$	$5,1x10^{1}$	$5,7x10^{1}$	$1,3x10^{2}$
Armazenamento de iogurte	$1,8x10^{1}$	$5,5x10^{1}$	$1,0x10^{2}$	$1,3x10^{2}$

Para a comparação da "performance" das técnicas usadas foi estabelecida a relação numérica de 1:3, correspondente às recomendações da APHA, ou seja, 30 $UFC.cm^{-2}.semana^{-1}$ e 90 $UFC.m^{-3}$. A impressão em ágar determinou contagens de aeróbios mesófilos e fungos filamentosos e leveduras entre 2,4 e 27 vezes maior. As relações numéricas foram maiores do que 1:3 em 67 % das análises efetuadas. Com base nessa relação, pode-se concluir que a técnica de impressão em ágar recuperou maior número de microrganismos presentes no ar dos ambientes avaliados.

O Quadro 20 mostra as contagens de microrganismos psicrotróficos no ar dos ambientes avaliados. Considerando que as câmaras de resfriamento em indústrias de laticínios apresentam condições propícias ao desenvolvimento de fungos, utilizou-se o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) para a detecção desse grupo microbiano em temperaturas baixas de incubação, além do ágar para contagem total (PCA), indicado para a detecção de bactérias. As contagens para esses grupos microbianos encontravam-se de 2,3 a 18,9 vezes acima da recomendação da APHA. Além disso, observou-se crescimento de fungos filamentosos e leveduras nas placas contendo PCA.

Quadro 20 - Contagens de microrganismos psicrotróficos pela técnica de impressão em ágar em câmaras de refrigeração de um laticínio

Câmara de resfriamento	Contagem em ACT	Contagem em BDA
Maturação de queijos	$7,6x10^{2}$	$1,7x10^{3}$
Salga de queijo	$2,4x10^{2}$	$2,1x10^{2}$
Armazenamento de iogurte	$1,0x10^{3}$	$6,5x10^{2}$

ACT = ágar para contagem total BDA = batata dextrose ágar

Observou-se pelo Quadro 21 que houve a predominância de fungos filamentosos e leveduras nos ambientes, que se caracterizam por serem microrganismos Gram-positivos. Na câmara de maturação de queijo e de salga de queijo contatou-se a presença de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; no entanto, as bactérias isoladas na câmara de armazenamento de iogurte eram Gram-positivas.

Quadro 21 - Caracterização morfológica e coloração Gram de microrganismos psicrotróficos isolados em ágar para contagem total nas câmaras de refrigeração de um laticínio. Percentual de colônias analisadas

Câmara de resfriamento	Fungos filamentosos e leveduras	Bactérias	Gram +	Gram -
Maturação de queijos	70	30	87	13
Salga de queijo	82	18	96	4
Armazenamento de iogurte	93	7	100	0

Assim, conclui-se que, de forma geral, o ar das câmaras de resfriamento encontrava-se em condições higiênicas inadequadas para o processamento e armazenamento de alimentos, apresentando contagens microbianas acima das recomendações da APHA, para as técnicas de impressão em ágar e sedimentação em placas.

A técnica de impressão em ágar recuperou maior número de microrganismos do ar dos ambientes, a microbiota era constituída principalmente de fungos filamentosos e leveduras, e a maioria das bactérias isoladas era Gram-positiva.

Referências

ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 76, p. 471-484, 1958.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1996. 182 p.

APHA – **Standard methods for the examination of dairy products.** 16. ed. Washington, D.C.: Richardson, G.H. American Public Health Association,1985.

CARDOSO,R.C.V. **Eficiência de Agentes Sanitizantes na Redução da Microbiota das Mãos de Manipuladores de Alimentos**. [S.l.:s.n.], 1993.

HAYES, P.R. **Food microbiology and hygiene**. 2. ed. London: [S.l.], 1995. p. 515.

HEDRICK, T.I.; HELDMAN, D.R. Air quality in fluid and manufactured milk products plants. **Journal of Milk and Food Technology**, Alban, N.Y., v. 32, p. 265-269, 1969.

HELDMAN, D.R. Significance and control of airborne contamination in milk and food plants. **Journal of Milk and Food Technology**, Alban, N.Y., v. 30, p. 13-17, 1967.

HELDMAN, D.R. Factors influencing air-borne contamination of foods. A review. **Journal of Food Science**, Chicago, I.L., v. 39, p. 962-969, 1974.

JOOSTEN, R.L. Methods to extend the shelf life of pasteurized milk. **Dairy Packaging Newsletter**, Brussels, n.12, p. 1-3, 1985.

KANG, Y.J.; FRANK, F.J. Biological aerosols: a review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, I.A., v. 52, n. 7, p. 512-524, jul. 1989.

KANG, Y.J.; FRANK, F.J. Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants. **Journal of Dairy Science**, Champaing, I.L., v. 73, p. 621-626, 1990.

LUTGRING, R.K. et al. Distribution and quantification of bioaerosols in poultry-slaughtering plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 7, p 804-810, 1997.

MACHER, M.J. **Air sampling methods for biological contaminants**. Net. U.S.A., 2000. Disponível em: <http://anderseninstruments.com/Macher.htm>. Acesso em: mar./ 2001.

MERCK. **Microbial air monitoring- MAS 100 air sampler**: techinical information. Net. Taiwan, 2001a. Disponível em:<http://www.merck.com.tw/>. Acesso: em mar/ 2001.

MERCK. **Air sampler MAS 100 system. Net. U.S.A., 2001b**. Disponível em: <http://www.merck.de/english>. Acesso em: abr. 2001.

MEHTA, S.K.; MISHRA, S.K.; PIERSON, D.L. Evaluation of three portable samples for monitoring airborne fungi. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, D.C., v. 62, n. 5, p. 1835-1838, maio 1996.

OTTAVIANI, F. Detection and control of fungal contamination of the air. Experience and methodological proposals. **Tecnologie Alimentari**, Itália, v. 5, n. 4, p. 16-26, 1982.

OTTAVIANI, F.; FRANCESCHETTI, E. Air – borne moulds in the dairy industry - Review. **Latte**, Milan, v. 7, n. 6, p. 446-455, 1982.

RADMORE, K.; HOLZAPFEL, W.H.; LUCK, W. Proposed guidelines for maximum acceptable airborne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdamn Netherlands, v. 6, p. 91-95, 1988.

REN, T. J.; FRANK, F. J. A survey of four fluid milk processing plants for airborne contamination using various samplig methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p 38-42, jan.1992a.

REN, T. J.; FRANK, F. J. Measurement of airborne contamination in two commercial ice cream plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p. 43-47, jan.1992b.

SAYER, W. J.; SHEAN, D. B.; GHOSSEIRI, B.S. Estimation of airborne fungal by the Andersen sampler versus the gravity settling culture plate. **Journal of Allergy**, St. Louis, p. 214-227, out. 1969.

SILVA, R.M.M. . **Especificações microbiológicas para ambientes**, manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1996.

SULLIVAN, J.J. Air microbiology and dairy processing. **Aust**. **Journal of Dairy Technology**, Highett Victoria, v. 34, p. 133-138, 1979.

SVEUM, W.H. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3rd. [S.l.]: APHA, 1992. cap. 3, p. 51.

TOSHIO, E. D. G. Departamento de Microbiologia – Diversey Lever/Brasil. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <valeriacosta@tdnet.com.br>, em 4 de jun. 2001.

VICKERS, VT. Control of airborne contamination in dairy processing plants. N. Zeal. **Journal of Dairy Science Technology**, v. 21, p. 89-98, 1986.

Capítulo 08

Metodologias Convencionais para Análises Microbiológicas e Equipamentos, Utensílios e Manipuladores na Indústria de Alimentos.

1. Introdução

1.1. Método do swab

1.2. Método da Rinsagem

1.3. Método da Placa de Contato

1.4. Método da Seringa com Ágar

1.5. Método da Esponja

2. Resultados de Avaliações das Condições Microbiológicas de Equipamentos, Utensílios e Manipuladores

2.1. Em Unidades de Alimentação e Nutrição

2.2. Em uma Indústria Processadora de Carne

2.3. Em uma Indústria de Laticínios: *Staphylococcus* spp. em Superfície de Equipamentos e Manipuladores

2.4. Em Microindústrias de Processamento de Leite

3. Referências

Nélio José de Andrade
Valéria Costa Salustiano
Roberta Torres Careli
Kelly Cristina Silva Brabes
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

1. Introdução

A implementação dos Procedimentos Operacionais (POP) deve ser avaliada periodicamente, de forma a garantir uma produção segura de alimentos. Para isso, é preciso adotar medidas corretivas, em casos de desvios desses procedimentos, evitando colocar em risco a saúde dos consumidores, pela veiculação de microrganismos patogênicos. É imprescindível, portanto, controlar e monitorar a contaminação, a multiplicação e a sobrevivência microbiana nos produtos, superfícies, equipamentos, utensílios e manipuladores, o que contribuirá para a obtenção de alimentos com boa qualidade.

A atuação dos profissionais responsáveis pela qualidade nas indústrias deve ser eminentemente preventiva. Se fundamentado em planos de amostragem bem definidos, o monitoramento microbiológico dos ambientes de processamento pode melhorar sensivelmente a qualidade, fornecendo informações sobre o nível e fonte de contaminação do produto. Os resultados obtidos com esse monitoramento, normalmente, podem ser comparados com as especificações ou com as recomendações propostas por órgãos oficiais ou por entidades científicas conceituadas, como a *American Public Health Association* (APHA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Panamericana de Saúde (OPAS). Dependendo dos resultados, mantêm-se as técnicas de higienização adotadas ou são tomadas medidas corretivas.

Quando determinado procedimento de higienização, durante o processamento de alimentos, não é eficiente ou falho, o primeiro indício do problema pode ser o aumento nos números de contaminantes microbianos, reforçando ainda mais a importância da implantação de um programa de monitoramento. Por isso, a escolha de um método adequado deve estar de acordo com a situação específica, considerando-se o tipo de alimento processado.

Os principais fatores que influenciam a escolha do método para a avaliação de superfícies na indústria são o tipo de microrganismo contaminante, em virtude das condições de sobrevivência e sua concentração esperada; da geometria e as condições das superfícies, envolvendo a presença de ranhuras e de resíduos de detergentes, de sanitizantes e de alimentos.

Não há uma metodologia universal para se realizar uma avaliação microbiológica na indústria. Entretanto, pela combinação de metodologias, é possível verificar as condições higiênicas durante o processamento dos alimentos. Como qualquer análise, o sucesso e a eficiência do método dependem do conhecimento prévio sobre distribuição e adesão bacteriana, sobrevivência e recuperação de microrganismos sob injúrias.

A limpeza e sanitização dos equipamentos são etapas fundamentais no controle sanitário em indústrias de alimentos, muitas vezes negligenciadas ou efetuadas em

condições inadequadas. Programas de higiene envolvem o uso de equipamentos e materiais que facilitem a limpeza. É necessário também identificar o tipo de resíduo a ser removido, como proteínas, carboidratos, lipídios e minerais. Outro fator de destacada importância é conhecer a qualidade da água a ser utilizada e selecionar agentes de limpeza e empregar adequadamente as concentrações, o tempo, a temperatura e a pressão, de forma a obter uma limpeza e desinfecção corretas.

A capacidade de determinar o grau de contaminação bacteriana em superfícies de contato com alimentos, usando-se um procedimento acurado, de fácil manuseio, é de fundamental importância para a indústria de alimentos. Dentre as metodologias usuais para a enumeração de microrganismos, estão os testes de rinsagem, do *Swab* e das placas de contato, sendo os dois últimos mais comumente escolhidos para o controle das condições higiênico-sanitárias na indústria de alimentos.

1.1. Método do *Swab*

O método do *Swab*, desenvolvido em 1917 por Manheimer e Ybanez, é o mais antigo e utilizado para avaliar as condições microbiológicas ambientais. É considerado como classe A pela APHA, ou seja, uma metodologia-padrão para a remoção de microrganismos de superfícies.

Essa técnica consiste em friccionar um *Swab* esterilizado e umedecido em solução diluente apropriada, na superfície a ser avaliada, com o uso de um molde esterilizado que delimita a área amostrada, por exemplo 100 cm^2. Aplica-se o *Swab* com pressão constante, em movimentos giratórios, numa inclinação aproximada de 30°, descrevendo movimentos da esquerda para a direita inicialmente e, depois, da direita para esquerda (Figura 1). A parte manuseada da haste do *Swab* deve ser quebrada na borda interna do frasco que contém a solução da diluição, antes de se mergulhar o material amostrado com os microrganismos aderidos. O diluente é então examinado por plaqueamento de alíquotas em meio de cultura apropriado, e o resultado é dado por UFC. cm^{-2} de superfície.

Os *Swabs* podem ser usados em superfícies irregulares e curvas, devendo ter cerca de 12 cm de comprimento de haste, com a parte absorvente (algodão) com aproximadamente 2 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro. A facilidade de remoção da microbiota da superfície depende da rugosidade e natureza desta e do tipo de microrganismo presente.

Os *Swabs* com alginato de cálcio têm a vantagem de liberar os microrganismos para o diluente pela dissolução do alginato, e, embora o alginato e componentes dissolvidos no meio de diluição possam inibir o crescimento microbiano, esses *Swabs* têm boa "performance". Nos *Swabs* de algodão, os microrganismos podem ficar aderidos às fibras e subestimar as contagens.

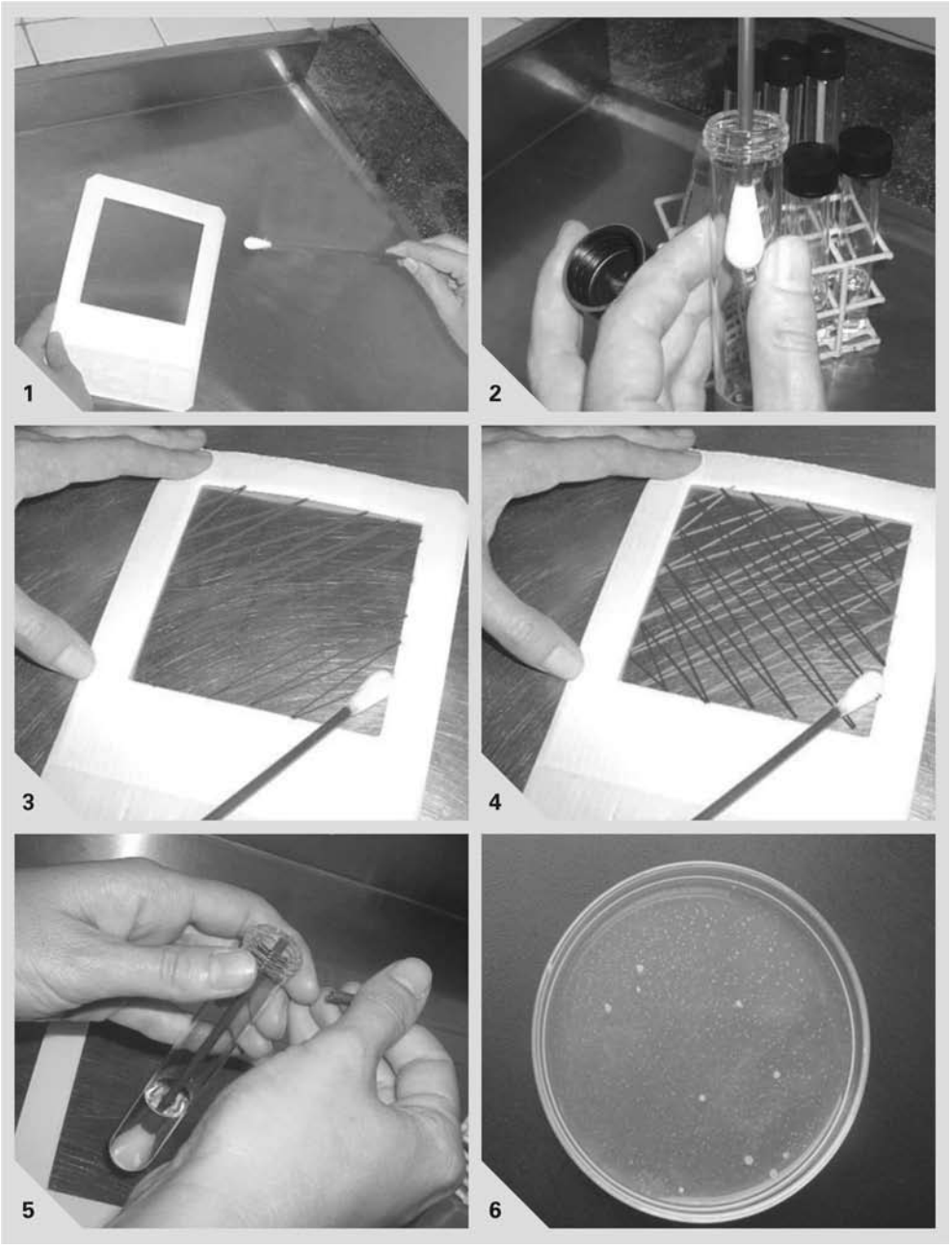


Figura 1 - Metodologia do *Swab* para coleta em superfícies de processamento de alimentos.

Em situações em que se deseja verificar a eficiência de procedimentos de higienização e sanitização, agentes neutralizantes específicos devem ser adicionados ao diluente. Para sanitizantes que atuam por oxidação, como cloro, iodo e ácido peracético, recomenda-se como neutralizante uma solução de tiossulfato de sódio a 0,25 %. Para outros sanitizantes como amônia quaternária e clorhexidina, sugere-se solução de lecitina ou tween 80 % a 2 %. Além disso, recomenda-se o uso do que se

denomina neutralizante universal, cuja composição é capaz de neutralizar qualquer tipo de resíduo de sanitizante.

Mesmo com limitações, o *Swab* é um método rápido, simples e barato de verificação das condições higiênicas ambientais.

1.2. Método da Rinsagem

O método da rinsagem consiste em remover os microrganismos das superfícies, usando-se a técnica da lavagem superficial, com certo volume de diluente. Posteriormente, determina-se a população bacteriana da solução de rinsagem, pelo plaqueamento de uma alíquota ou por técnicas de filtração (EVANCHO et al., 2001).

Para a análise de tanques de leite, volumes de 20 mL de solução de rinsagem devem ser usados para aqueles de capacidade de até 1000 L, enquanto para tanques maiores devem ser utilizados de 50 a 100 mL de diluente.

1.3. Método da Placa de Contato

As placas de contato para a análise microbiológica são indicadas em superfícies planas, pressionando-se contra elas o meio de cultura sólido. Para a remoção dos microrganismos, um contato de cinco segundos sob pressão do meio com a superfície a ser avaliada é o suficiente para uma boa remoção das células. Após a incubação das placas, as unidades formadoras de colônias são contadas, a fim de se avaliarem as condições microbiológicas da superfície amostrada.

Em 1964, Hallee Hartnett desenvolveram as placas de contato *Replicate Organism Direct Agar* (RODAC). As disponíveis comercialmente são preenchidas com uma camada de 15,5 a 16,5 mL de meio de cultura, que ultrapassa a borda da placa de Petri, permitindo o contato facilitado do meio de cultura com a superfície analisada. Essas placas fornecem boa avaliação das condições higiênicas da superfície e são muito utilizadas, em razão da facilidade e conveniência, sendo o método de escolha para superfícies úmidas, firmes e não porosas e, por isso, ineficazes para superfícies muito contaminadas, exceto quando este problema é minimizado pelo uso de meios seletivos de análise.

De acordo com estudos, o método RODAC remove somente cerca de 0,1% da microbiota da superfície, o que sugere que 10 UFC. cm^{-2} detectado refere-se a uma contaminação real de aproximadamente 10^4 UFC. cm^{-2}.

Quando superfícies de aço inoxidável foram contaminadas por esporos de *Bacillus subtilis*, removeram-se 41 % dos esporos pelas placas RODAC e 47% pelo método de *Swab*. Em outro estudo, *Swabs* apresentaram melhor desempenho em relação às placas RODAC, quando a contaminação era supe-

rior ou igual a 100 UFC/21-25 cm^2; porém, em contagens menores, as placas de contato mostraram melhores resultados.

Para superfícies curvas ou com ranhuras, as placas Petrifilm, comercializadas pela empresa 3M, podem ser utilizadas para a avaliação por contato direto. Essas placas contêm uma camada de meio de cultura na forma de gel, em um filme flexível, com um indicador, para facilitar a enumeração das colônias. Após a hidratação asséptica do gel com 1 mL de solução de diluição esterilizada, a placa pode ser então pressionada contra a superfície a ser avaliada, sendo posteriormente incubada de forma usual. Uma vantagem dessa técnica é que o gel pode ser moldado, comprimindo-o contra a superfície curva.

O uso de neutralizantes no meio de cultura utilizado nas placas de contato também é necessário quando a eficiência de processos de higienização e sanitização está sendo avaliada.

1.4. Método da Seringa com Ágar

Neste método, o meio de cultura apropriado aos microrganismos sob avaliação é adicionado a uma seringa ou a um tubo de plástico, onde o meio solidifica-se. Após o contato do meio com a superfície, corta-se, com uma espátula esterilizada, uma fatia de aproximadamente 1 cm de espessura desse meio, que é coletado numa placa de Petri para a incubação adequada. As vantagens e desvantagens desse método são semelhantes às mencionadas com relação às placas RODAC. Normalmente, devem-se amostrar no mínimo cinco impressões, ou seja, coletam-se cinco fatias. O resultado é expresso em UFC. cm^{-2}, sendo a área de cada fatia determinada pela equação: $A=3,1416xr^2$, em que A=área de contato do meio com a superfície e r = raio da fatia do meio de cultura, em cm.

1.5. Método da Esponja

Este método consiste em usar esponjas de poliuretano, esterilizadas, de dimensões aproximadas de 13 x 7 x 4 cm, para remoção dos microrganismos. Estes são coletados com o auxílio de uma bolsa esterilizada de plástico, de 30x40 cm, aproximadamente, a qual, no ato da coleta, será utilizada como luva, pois a superfície externa da bolsa entrará em contato com a pele da pessoa que realizará a tarefa. Vestido com a "luva", tira-se uma esponja que será friccionada de forma adequada na superfície que se deseja avaliar. Às vezes, é necessário umedecer a esponja com água peptonada esterilizada, principalmente quando a superfície estiver muito seca. Após a coleta, retira-se a "luva", retornando-a à posição original, com a face esterilizada para dentro e contendo a esponja com os microrganismos removidos da superfície. A partir daí, usa-se o procedimento convencional para as

contagens microbianas: os microrganismos são retirados da esponja, usando-se soluções diluentes, e plaqueados em meios de cultura, sendo as placas incubadas em condições apropriadas. O resultado é expresso em UFC. cm^{-2}.

2. Resultados de Avaliações das Condições Microbiológicas de Equipamentos, Utensílios e Manipuladores

Na seqüência, são apresentados resultados de avaliações de manipuladores e equipamentos em empresas produtoras de alimentos, com diferentes níveis tecnológicos, usando-se a técnica do *Swab*. Foram avaliadas: i) uma rede de unidades de alimentação e nutrição, com nível tecnológico razoável; ii) uma empresa produtora de derivados de carne, com bom nível tecnológico, e que inclusive exporta para alguns países; iii) uma indústria de laticínios de tamanho médio, com bom nível tecnológico; e iv) microindústrias para processamento de leite e derivados, as quais necessitavam de informações básicas para estabelecer boas práticas de fabricação.

2.1. Em Unidades de Alimentação e Nutrição

Para avaliação das condições microbiológicas de equipamentos e utensílios, foram realizadas 17 visitas a 12 unidades de alimentação e nutrição, localizada nas regiões da Zona da Mata e Metalúrgica de Minas Gerais, com capacidade para produção de 1.000 a 4.000 refeições/dia. Trinta e seis equipamentos e utensílios foram avaliados nos diversos restaurantes, incluindo cortadores de frios, cortadores de legumes, máquina de moer carne, placa de altileno, bandejas de refeição, talheres, pratos de louça e liquidificadores.

Os microrganismos foram removidos das superfícies consideradas higienizadas pela técnica do *Swab*, conforme recomendação da APHA (EVANCHO et al., 2001), utilizando-se *Swab* de algodão não-absorvente, de 0,5 cm de diâmetro/2 cm de comprimento, em uma haste de 12 cm de comprimento, que foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C, por 15 min. Após ser umedecido, o *Swab* foi friccionado, por três vezes, formando um ângulo de 30° com a superfície, no sentido vaivem, numa área de 2 x 25 cm. Em seguida, os microrganismos coletados foram transferidos para tubos de ensaio, de 20 x 250 mm, contendo 10 mL de solução neutralizante de tiossulfato de sódio 0,25 % em solução Ringer 1:4, pH 7,0, esterilizada por autoclavagem a 121 °C por 15 min. Após a imersão, o excesso de solução do *Swab* foi retirado, pressionando-o na superfície do tubo. Esse mesmo *Swab* foi utilizado para coletar microrganismos em outra área de 2 x 25 cm da mesma superfície e transferidos para o mesmo tubo de ensaio. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes, totalizando uma área de 250 cm^2. Quando havia dificuldades para se determinar essa

área nos equipamentos, foram feitas estimativas, sendo as coletas efetuadas sempre da mesma forma. Depois da remoção dos microrganismos das superfícies, realizaram-se diluições adequadas, seguidas de plaqueamento e incubação em condições apropriadas aos microrganismos sob avaliação.

Verificou-se, em relação aos mesófilos aeróbios, que apenas 18,5 % dos equipamentos e utensílios avaliados encontravam-se corretamente higienizados, segundo a recomendação da APHA, que é de 2 UFC. cm^{-2}. Usando essa mesma recomendação para fungos e leveduras, constatou-se que 32,28 % dos ambientes apresentavam condições satisfatórias de higiene.

Muitas vezes, essa recomendação americana é considerada rígida para os restaurantes brasileiros. As recomendações da APHA ou da OMS devem ser utilizadas apenas como referência, pois é de se esperar que, dentre os restaurantes nacionais, encontram-se aqueles que trabalham dentro de condições preconizadas pela APHA e, também, muitos outros, provavelmente a maioria, que não atendem às recomendações adotadas nos EUA.

Alguns pesquisadores e algumas instituições como a OPAS e a OMS admitem contagens de até 50 UFC.cm^{-2} de superfície, e, nesse caso, os porcentuais de 52,9 para microrganismos mesófilos aeróbios, 76,7 para coliformes totais e 77,1 para fungos e leveduras encontram-se dentro dessa recomendação.

2.2. Em uma Indústria Processadora de Carne

2.2.1. Superfícies

Superfícies do misturador, do picador de toucinho, da embaladora de lingüiça, da embaladora de salsichão, da embutideira de lingüiça e da mesa da linha de processamento de lingüiça foram avaliadas quanto à contaminação microbiana, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Mesófilos aeróbios (UFC. cm^{-2}) em superfícies de processamento de uma indústria de produtos cárneos

Repetições	Misturador	Picador de toucinho	Embalador de linguiça	Embalador de salsichão	Embutidor de linguiça	Mesa da linha de linguiça
01	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
02	< 0,1	182	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
03	2,0	18	17	11	< 1,0	< 0,1

As superfícies de todos os equipamentos analisados apresentaram contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais e *Staphylococcus* spp. abaixo do valor recomendado pela APHA (2 UFC. cm^{-2}). Com relação a fungos filamentosos e leveduras, 77,7 % dos equipamentos mostraram contagens abaixo dessa recomendação e apenas 23,3 % não se enquadraram.

2.2.2. Manipuladores

Ao realizar a coleta de microrganismos nas mãos dos manipuladores, usou-se a seguinte técnica (Figura 2): um *Swab* com haste de 12 cm de comprimento e algodão hidrófilo de 2,5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro, utilizando o *Swab* esterilizado e iniciando a coleta com *Swab* umedecido em solução-tampão-fosfato, friccionando o algodão três vezes em direção a cada um dos dedos a partir do punho. Em seguida, a começar do punho, friccionou-se o algodão do mesmo *Swab* entre os dedos, retornando novamente ao punho. Os microrganismos coletados foram transferidos para o tubo contendo 10 mL de tampão-fosfato, acrescentando-se agentes neutralizantes para inativar possíveis quantidades residuais de agentes sanitizantes. Por exemplo, para cloro, iodo, ácido peracético usou-se como agente neutralizante solução com 0,25 % de tiossulfato de sódio e para amônia quaternária, solução de lecitina 2 %. Em seguida, plaquearam-se diluições adequadas para meios de cultura e incubaram-se as placas nas condições apropriadas a cada microrganismo: ágar para contagem total e 32 °C por 48 h para mesófilos aeróbios; ágar *Violet Red Bile Agar* (VRB) e 37 °C por 24 h, para coliformes totais e ágar Baird Parker e 30 °C por 24 h, para *Staphylococcus* spp. As placas foram incubadas nas condições de crescimento de cada grupo ou espécie microbiana. Os resultados foram expressos em UFC/mão.

Não há padrões ou especificações para contagens microbianas em mãos de manipuladores de alimentos, por isso procurou-se determinar faixas de contagens que pudessem servir de orientação para definir as condições higiênico-sanitárias de manipuladores. Foram consideradas as seguintes faixas, expressas em UFC/mão: para mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras e coliformes totais: Faixa I - até 10^3 UFC/mão e II - entre 10^3 e 10^4 UFC/mão; e para *Staphylococcus* spp: Faixa I - até 10^2 UFC/mão e Faixa II - entre 10^2 e 10^3 UFC/mão, conseguindo-se os seguintes resultados: i) 44,4 %, 5,5 % e 5,5 % das mãos dos manipuladores apresentavam contagens de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e coliformes totais entre 10^3 e 10^4 UFC/mão, respectivamente; e ii) 55,6 %, 94,4 %, 94,4 %, das mãos dos manipuladores apresentavam contagens desses microrganismos de até 10^3 UFC/mão. Para *Staphylococcus* spp, a distribuição da contagem nas mãos foi de 5,6 % entre 10^2 e 10^3 UFC/mão e o restante, até 10^2 UFC/mão. Na Figura 3 é mostrada a porcentagem dos diferentes microrganismos presentes nas mãos de manipuladores.

Figura 2 - Metodologia do *Swab* para coleta em superfícies de mãos.

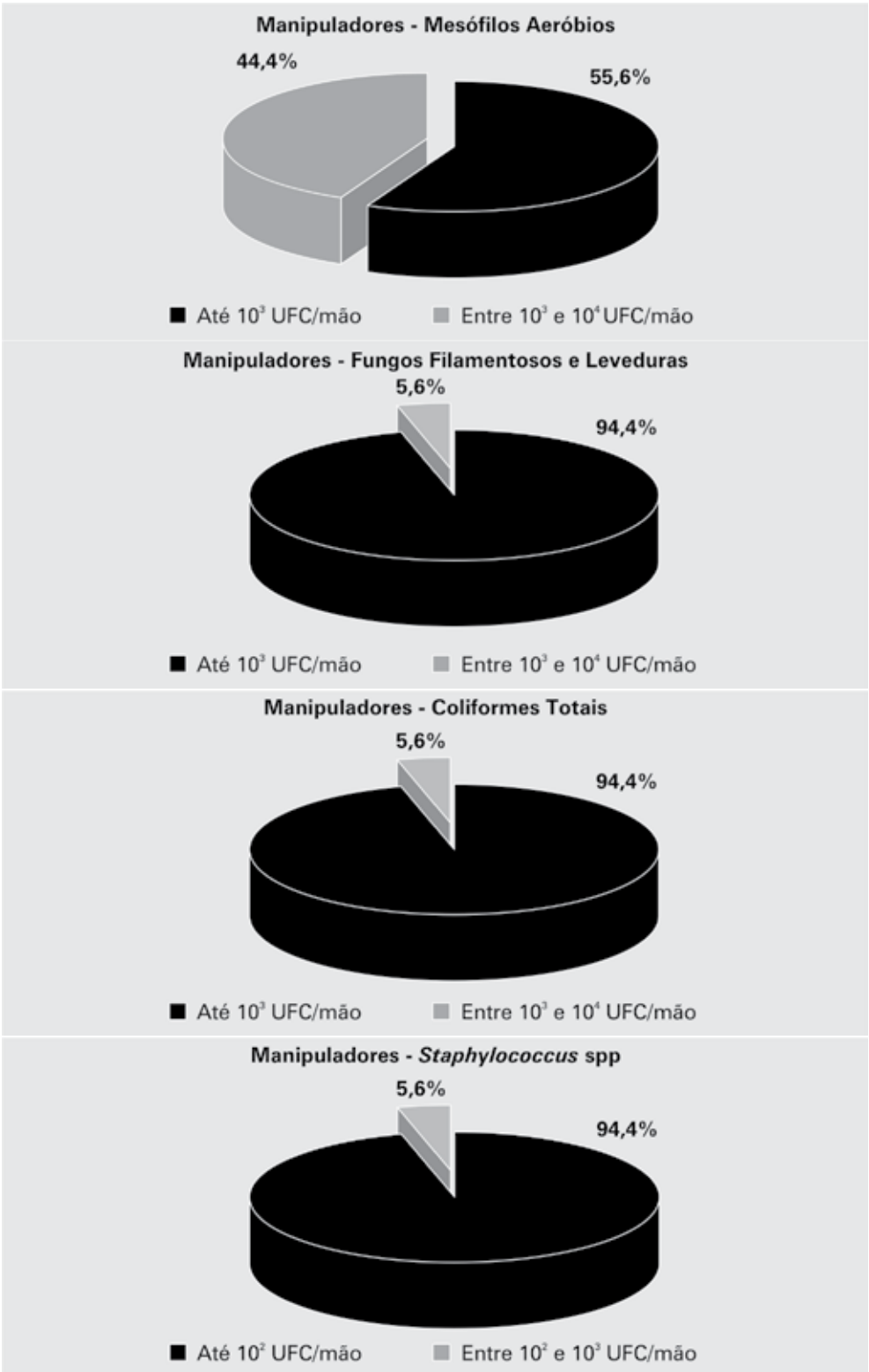


Figura 3 - Avaliação microbiológica de manipuladores de alimentos.

2.3. Em Indústria de Laticínios: *Staphylococcus* spp em Superfícies de Equipamentos e Manipuladores

2.3.1. Enumeração

As amostras para avaliação da qualidade microbiológica foram coletadas nas mãos de manipuladores, nas superfícies do tanque de leite da plataforma de recepção, do tanque de pasteurização de leite, da embaladora de leite pasteurizado, dos tachos de processamento de manteiga e doce de leite, do tanque de processamento de queijos e de produção de iogurte, totalizando sete superfícies. Os microrganismos foram removidos das superfícies de equipamentos e das mãos consideradas higienizadas, já mencionado no item 2.2. Após a coleta, a partir dos tubos contendo os microrganismo prepararam-se as diluições apropriadas, que, em seguida, foram plaqueadas, usando-se Ágar Baird-Parker, e incubadas a 35 °C, por 24 h (EVANCHO, 2001). Os resultados obtidos em UFC. cm^{-2} de superfície ou UFC/mão foram convertidos em log_{10}, avaliados descritivamente e comparados com as especificações ou recomendações da APHA e de alguns pesquisadores e instituições.

2.3.2. Identificação

Para a purificação dos isolados, foi utilizado o meio de cultivo Ágar Baird-Parker, onde foram selecionadas cepas características e não-características: i) colônias negras e lustrosas, devido à precipitação de telurito de potássio; e ii) com e sem halo transparente ao redor das colônias.

As colônias características foram repicadas em ágar para contagem total (*Plate Count Agar*) a 37 °C, por 24 h. Estas cepas foram testadas bioquimicamente: i) produção de coagulase livre; ii) catalase, utilizando-se H_2O_2 a 30 %; iii) oxidase; e iv) hemólise, em meio sólido adicionado de sangue de carneiro.

Os isolados de *Staphylococcus*, quanto às espécies, foram identificadas pelo sistema de identificação de estafilococos e micrococos *API Staph da Biolab-Merieux*, que é composto por testes bioquímicos padronizados e miniaturizados.

Após a identificação pelo sistema *API/Staph (Biomerieux)*, as cepas foram submetidas à produção de enterotoxinas. Para a identificação das enterotoxinas, as cepas foram agrupadas em *pools* contendo em média três amostras, utilizando-se para isso as mesmas espécies e com características bioquímicas semelhantes. Para esse teste, utilizaram-se cinco repetições, para a confirmação de positividade no caso da presença de algum tipo de enterotoxina com o desmembramento dos *pools*.

Constata-se, pelos resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, que houve o isolamento de 91 cepas, sendo 51 delas provenientes de manipuladores e 40 de superfícies que entravam em contato com alimentos.

Observa-se na Tabela 2, que entre as espécies isoladas das mãos de manipuladores avaliados, ocorreu a prevalência do *S. aureus*, com um porcentual de cerca de 22 %, portanto, acima daquele encontrado nos ambientes de processamento.

Tabela 2 - Especies de *Staphylococcus* isoladas de mãos de manipuladores de um laticínio

Espécies	%
S. aureus	21,59
S. epidermidis	19,60
S. xylosus	17,64
S. warneri	11,76
S. chromogenes	7,85
S. saprophyticus	3,92
S. lentus	5,88
S. cohnii cohnii	1,96
S. haemolytientucus	1,96
S. hominis	1,96
identificação inaceitável	5,88
Total (51)	**100**

Como ocorre normalmente em qualquer programa de segurança alimentar nas indústrias, os manipuladores representam uma das principais fontes de contaminação e, embora não existam padrões na legislação brasileira, a presença de estafilococos pode indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Tal fato evidencia a necessidade real de treinamento dos funcionários que trabalham diretamente com a linha de produção dos alimentos, independentemente dos tipos de estabelecimentos.

Observa-se, pela Tabela 3, que em superfícies para processamento de produtos lácteos foram encontrados 27,5 % de *S. aureu*s, seguidos de 25 % identificados por *S. xylosus*. Das 91 cepas isoladas e submetidas à identificação, 65,7 % foram caracterizadas como coagulase negativa e 34,3 %, como coagulase positiva. Dos isolados coagulase negativa, 5,5 % foram identificados como *S. aureus;* dos isolados coagulase positiva, 84,6 %. Esses resultados demonstram que a prova de coagulase é variável, não podendo ser relacionada à patogenicidade das espécies de estafilococos. A coagulase livre é uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente *S. aureus*, que reage com plasma de coelho formando coágulos. Esse teste tem sido largamente utilizado para identificação de *S. aureus* patogênicos.

Tabela 3 - Espécies de *Staphylococcus* isoladas da superfícies de equipamentos de laticínios

Espécies	%
S. aureus	27,50
S. xylosus	25,00
S. lentus	7,50
S. epidermidis	5,00
S. capitis	2,50
S. saprophyticus	2,50
S. simulans	25,00
Total (51)	**100**

As pesquisas têm sugerido um teste adicional que identifique a produção ou não de enterotoxina por testes imunológicos, devido ao fato de cepas com características de não produção de coagulase terem sido incriminadas em razão de surtos de intoxicação alimentar. Um surto causado por espécies não produtoras de coagulase envolveu 40 estudantes, na cidade de Osaka, Japão. Outro surto relatado por Breckinridge e Bergdoll (1971), envolvendo 264 pessoas, foi causado por alimentos contaminados com *S. epidermidis*, uma espécie não produtora de coagulase, porém de SEA.

Em face desses resultados, observa-se que é necessário o uso de programas de higienização para melhor avaliar e controlar o ar do ambiente, das superfícies que entram em contato com os alimentos e dos manipuladores que trabalham diretamente na linha de produção com contato direto com os alimentos. Diferentes espécies de estafilococos foram identificadas nessas três situações, destacando-se que esses microrganismos podem representar uma fonte de recontaminação dos alimentos. Os tipos de enterotoxinas, para cada fonte de origem, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tipos de enterotoxinas produzidas por espécies de *Staphylococcus* isoladas de superfícies, manipuladores e ar de ambientes de processamento de um laticínio

Espécies	Origem	Tipo de enterotoxina estafilocócica			
		SEA	SEB	SEC	SED
S. lugdunenensis	Superficie	+	+	+	+
S. capitis	Superficie	+	+	+	+
S. xylosus	Superficie	+	+	+	+
S. xylosus	Superficie	+	+	+	+
S. xylosus	Superficie	+	+	+	+
S. saprophyticus	Manipulador	+	+	+	+
S. hominis	Manipulador	-	+	+	+
S. capitis	Manipulador	+	+	+	+
S. epidermidis	Manipulador	+	+	+	+
S. epidermidis	Manipulador	+	+	+	+
S. epidermidis	Manipulador	+	+	-	+
S. saprophyticus	Manipulador	+	+	+	+
S. haemolyticus	Ar ambiente	+	+	+	+
S. epidermidis	Ar ambiente	+	-	-	+
S. epidermidis	Ar ambiente	+	-	+	+
S. sciuri	Ar ambiente	+	+	+	+
S. saprophyticus	Ar ambiente	+	+	+	+

Observa-se, pelos resultados, que todas as cepas produtoras de enterotoxinas são de espécies coagulase negativa, contrariando aspectos conhecidos de patogenicidade e de legislação. Observa-se também que, na maioria dos casos, uma única cepa foi capaz de produzir mais de um tipo de enterotoxina, de acordo com a interpretação do kit SET-RPLA. É necessário salientar ainda a necessidade

de não se excluírem os microrganismos com essas características bioquímicas do risco para a saúde pública.

2.4. Em Microindústrias de Processamento de Leite

Em 2003, avaliaram-se as condições higiênicas no processamento de leite de microindústrias na região da Zona da Mata de Minas Gerais, assistidas pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM). Foram aplicados questionários de avaliação com 32 itens, envolvendo a obtenção do leite, a estrutura física, as condições de processamento e a manipulação. Propuseram-se também os fundamentos para implantação de sistema de higienização para esses estabelecimentos. Na Tabela 5 foram mostradas algumas informações acerca de características de obtenção da matéria-prima utilizada nas microindústrias avaliadas.

Tabela 5 - Avaliação do leite processado em algumas microindústrias de laticínios

Matéria-prima	% de microindústrias	
	Sim	Não
Realizavam algum tipo de controle microbiológico	20	80
Treinamento	60	40
Estocagem em local apropriado	20	80
Matéria-prima proveniente da propriedade	60	40

O leite utilizado nas microindústrias era caracterizado por algum tipo de controle de qualidade, por exemplo a realização do teste do alizarol. Os responsáveis pela produção, na sua maioria, não eram treinados em processamento de produtos lácteos. O leite normalmente não era estocado de forma adequada, embora em alguns casos fosse processado logo após a ordenha.

As microindústrias, em sua maioria, eram construídas em áreas inadequadas quanto às condições gerais de higiene, como a proximidade de granja, curral, galinheiro, brejo e fábrica de suco, o que contribuía para o mau cheiro e atração de moscas. Em todas as microindústrias era utilizada a pasteurização lenta (65 °C/30 min) da matéria-prima. Porém, em algumas delas, esse processo era realizado de maneira inadequada, devido às falhas no controle do binômio tempo-temperatura. Em virtude do pequeno porte das empresas, era inviável a existência de um laboratório de análise, e por causa dessa limitação esse serviço era terceirizado, sendo as análises realizadas esporadicamente.

Em relação aos equipamentos e utensílios, foram avaliadas as condições de conservação e funcionamento, como: presença de solda, ranhuras, ferrugem, equipamentos velhos e desgastados e funcionamento adequado dos equipamentos.

As microindústrias eram vistoriadas periodicamente pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) e por veterinários que controlavam a sanidade do rebanho. As microindústrias, em sua maioria, não costumavam ter produtos de retorno, devido à pequena produção e ao consumo praticamente imediato do produto. Quando ocorria algum retorno, o produto era consumido pela família e empregados.

Na Tabela 6 são mostradas algumas informações acerca de características de consições de processamento nas microindústrias selecionadas.

Tabela 6 - Condições de processamento de uma microindústria de laticínios

Condições de processamento	% de microindústrias	
	Sim	Não
Construída em áreas onde os arredores não ofereciam risco	20	80
Pasteurização do leite	80	20
Realizavam análise terceirizada do produto final	80	20
Captavam água de poços semi-artesianos	60	40
Armazenamento de insumo em condições razoáveis	100	00
Equipamentos e utensílios em bom estado de conservação	40	60
Produtos de higienização recomendados por especialista	40	60
Recebiam algum tipo de assistência técnica	100	00
Tratamento de resíduos	00	100

Os resíduos não eram tratados pelas microindústrias, por exemplo o soro era destinado à produção de ricota, bebida láctea (para o consumo da família) e alimentação do rebanho, contribuindo, dessa maneira, para a preservação do meio ambiente.

Na Tabela 7 são mostradas algumas informações acerca de características da estrutura física das microindústrias de laticínios.

Tabela 7 - Estrutura física de uma microindústria de laticínios

Estrutura física	% de microindústrias	
	Sim	Não
Projeto de construção	40	60
Espaço físico razoável	40	60
Vestiários afastados da área de produção	100	0
Boas condições de ventilação, portas e janelas teladas, pédilúvio, paredes, plataformas e iluminação	60	40
Razoáveis instalações hidráulicas e elétricas e produção de vapor	40	60

Em geral, as microindústrias não foram projetadas para a fabricação de produtos lácteos, mas, à medida que a fiscalização e também a assistência técnica se intensificavam, essas empresas estavam se adequando às especificações vigentes. Por exemplo, preocupavam-se em melhorar o sistema de ventilação, as instalações

hidráulicas e elétricas e a implantação de portas teladas. Um fator preocupante era a geração de vapor, pois as microindústrias não possuíam estrutura adequada para isso, utilizando em sua maioria aquecimento a gás. Além disso, muitas delas não tinham espaço físico adequado. Em geral, os sanitários localizavam-se ao lado da microindústria, na residência do proprietário, por ser produção familiar.

Na Tabela 8 são apresentadas algumas informações acerca de características de pessoal nas microindústrias selecionadas.

Tabela 8 - Condições higiênicas de manipuladores de uma microindústria de laticínios

Pessoal/manipuladores	% de microindústrias	
	Sim	Não
Com manipuladores completamente uniformizados durante o trabalho	20	80
Unhas em bom estado de conservação	80	20
Uniformes em bom estado de conservação	60	40
Calçado apropriado (botas)	50	50
Afastamento de funcionários quando não apresentavam bom estado de saúde	40	60
Realização de exame médico	60	40
Higienização adequada das mãos	60	40
Manipuladores não utilizavam acessórios	100	00

a) Vários funcionários utilizavam uniforme incompleto e, ainda, os que não utilizavam uniforme. b) Foram consideradas unhas em bom estado de conservação as mantidas curtas, limpas sem esmalte. c) Foram consideradas em bom estado de saúde pessoas que não apresentavam enfermidades infectocontagiosas ou que não mostravam inflamações, infecções na pele ou outras anormalidades. Foram considerados acessórios, brincos, anéis, colares, pulseiras, relógios e outros.

Em relação aos manipuladores, constatou-se que as microindústrias apresentavam condições bastante variadas. Em uma delas, manipuladores trabalhavam com uniforme completo, incluindo botas, gorro, calça e camisas brancas, avental, máscara, e mantinham cabelos aparados e totalmente cobertos pelo gorro. Em outras, manipuladores trabalhavam com uniforme incompleto, mas mantinham cabelos aparados e cobertos pelo gorro. E ainda, em outras, os manipuladores trabalhavam totalmente desuniformizados e sem gorro, touca, rede ou similares.

As empresas, em sua maioria, apresentavam manipuladores com unhas em bom estado, mantidas curtas, limpas e sem esmalte. Com relação ao estado de saúde dos manipuladores, havia situações diversas nas microindústrias, mas poucas delas providenciavam o afastamento de pessoas do trabalho de manipulação do alimento quando se encontravam afetadas por enfermidades infectocontagiosas ou quando apresentavam inflamações, infecções ou afecções na pele ou outras anormalidades. Boa parte das microindústrias submetia os manipuladores a exame médico pelo menos uma vez por ano. Mais da metade dos manipuladores higienizava as mãos adequadamente e não utilizava acessórios como brincos, anéis, colares, pulseiras, relógios e outros.

2.4.1. Qualidade Microbiológica das Áreas de Processamento, Equipamentos e Utensílios e Manipuladores

Para a obtenção de alimentos com boa qualidade, é necessário que equipamentos, utensílios e manipuladores estejam dentro de determinadas recomendações microbiológicas. Na Tabela 9, constatou-se que em todas as microindústrias analisadas foram encontradas contagens microbianas acima das recomendadas para a superfície. As análises de mesófilos aeróbios indicaram valores entre 14 % e 80 % acima das recomendações e as de coliformes totais valores, de 10 % e 83 %. Observa-se, portanto, a necessidade de melhoria das condições higiênicas dos equipamentos e utensílios em todas as microindústrias.

Tabela 9 - Avaliação microbiológica de superfícies de equipamentos em uma microindústria de laticínios

Microindústrias	Análises	
	Mesófilos aeróbios (%)	Coliformes totais (%)
A	20	20
B	14	10
C	80	40
D	78	83
E	24	38

* Mesófilos aeróbios: ≤ 5,0 x 10^1 UFC.cm^{-2}; coliformes totais: ≤ 1,0 x 10^0 UFC.cm^{-2}

Verifica-se, pela Tabela 10, que os manipuladores das microindústrias, em sua maioria, se encontravam com mesófilos aeróbios acima das recomendações, variando de 33 % a 100 %, à exceção dos manipuladores da microindústria B, que apresentaram contagens abaixo de 1,0 x 10^4 UFC/mão. Para coliformes totais, nenhuma análise mostrou contagens acima de 1,0 x 10^3 UFC/mão. É necessário que as microindústrias tenham maiores cuidados em relação ao controle da microbiota presente nas mãos dos manipuladores durante o processamento dos alimentos.

Tabela 10 - Avaliação microbiológica de mãos de manipuladores de uma microindústria de laticínios

Microindústrias	Análises	
	Mesófilos aeróbios (%)	Coliformes totais (%)
A	33	0
B	0	0
C	60	0
D	100	0
E	33	0

*Mesófilos aeróbios: ≤ 1,0x10^4 UFC/mão; coliformes totais: ≤ 1,0x10^3 UFC/mão

2.4.2. Avaliação dos Procedimentos de Higienização Implantados na Microindústria Selecionada

De acordo com os resultados dos itens anteriores, selecionou-se uma microindústria para proposição e implantação de um Programa de Boas Práticas de Fabricação que, posteriormente, foi avaliado. O critério de seleção baseou-se em interesse, permissão e disposição do proprietário em implantar o sistema de higienização, o qual foi constituído de várias etapas, descritas subseqüentemente.

2.4.2.1. Proposição e Implantação

A. Cloração da Água

Para a cloração da água, utilizou-se um clorador por difusão, cuja operação consistiu nos seguintes passos: i) misturar 340 g de hipoclorito de cálcio com 850 g de areia lavada; ii) colocar essa mistura em embalagem plástica, de aproximadamente, 1 L; iii) fazer duas perfurações de 0,6 cm de diâmetro, a 10 cm abaixo do gargalo, para que o cloro pudesse ser liberado; e iv) amarrar o clorador ao fio ou fita de náilon e colocá-lo na água a poucos centímetros abaixo do nível. Essa mistura é suficiente para tratar 2.000 L de água, por cerca de 30 dias. Quando a quantidade de água for superior a 2.000 L ou quando há retirada diária muito grande de água, recomenda-se colocar mais de um clorador. Para verificar o nível de cloro residual, adiciona-se três gotas de solução de N,N-dietil-p-phenylenediamine (DPD) a 0,1 %, em cerca de 10 mL de água. A presença de cloro é confirmada pela coloração rósea.

B. Higienização do Reservatório de Água

O reservatório de água foi higienizado, seguindo-se estes passos: a) esvaziar a caixa de água; b) escovar toda a superfície interna; c) enxaguar abundantemente; d) sanitizar, adicionando 2 L de hipoclorito de sódio (água sanitária com 2 % de CRT) para cada 1.000 L de água; e) deixar o cloro em contato por 1 a 2 h, f) escoar toda a água clorada; e g) encher o reservatório para posterior cloração, utilizando-se o clorador por difusão.

C. Higienização do Ar dos Ambientes de Processamento

Pulverizar, com uma solução clorada a 100 mg. L^{-1} de cloro residual total (CRT), toda a área de processamento. Recomendou-se que tal procedimento fosse efetuado duas vezes por semana.

D. Higienização de Equipamentos e Utensílios

Higienizar equipamentos e utensílios, seguindo-se a rotina de higienização listada a seguir:

1. Limpeza alcalina, realizada diária e imediatamente após o processamento:

a) pré-lavagem com água à temperatura ambiente; b) limpeza com detergente de baixa alcalinidade, à base de tensoativos, com o auxílio de uma esponja apropriada, utilizando-se água morna, se possível; c) enxágüe com água à temperatura ambiente; e d) sanitização, com água clorada a 100 mg. L^{-1} CRT.

2. Limpeza alcalina/ácida: realizada uma vez por semana e imediatamente após o processamento. Esta limpeza foi proposta para o tanque de fabricação, empacotadeira e envasadora de iogurte:

a) pré-lavagem com água à temperatura ambiente; b) limpeza com detergente de baixa alcalinidade, à base de tensoativos, com o auxílio de uma esponja apropriada, utilizando-se água morna, se possível; c) enxágüe com água à temperatura ambiente; d) limpeza ácida com ácido nítrico 0,5%, com o auxílio de uma escova apropriada, utilizando-se água à temperatura ambiente; e) sanitização com água clorada a 100 mg. L^{-1} de CRT.

D.1. Observações Sobre a Higienização de Utensílios

Fôrmas para fabricação de queijos: depois de higienizadas, foram imersas em água clorada (100 mg. L^{-1} de CRT) por cerca de 30 min, colocadas para escorrer e, antes de serem novamente utilizadas, foram rapidamente imersas em água clorada.

Coadores e dessoradores: depois de higienizados, foram imersos em água clorada (100 mg. L^{-1} de CRT) por cerca de 10 min, colocados para escorrer e, antes de serem novamente utilizados, foram rapidamente imersos em água clorada.

No caso de utensílios de aço inoxidável, como mesa, agitador, lira e tanque de fabricação, seguiu-se o processo de limpeza alcalina, sendo o tanque submetido a uma limpeza ácida uma vez por semana, para evitar problemas de formação de pedra de leite.

Mesa de granito: seguiu-se o processo de limpeza alcalina e, logo após essa higienização, foi sanitizada com água clorada contendo 100 mg.L^{-1} de CRT, por aproximadamente 10 min.

D.2. Observações sobre a higienização de pisos e paredes azulejadas

Os pisos e as paredes azulejadas foram higienizados diariamente, ao final das atividades, utilizando-se detergente alcalino, com o auxílio de uma esponja apropriada, enxaguados com água em abundância e sanitizados com água clorada a 100 mg. L^{-1} de CRT.

D.3. Observações sobre a Higienização de Manipuladores

Os manipuladores seguiram este procedimento de higienização: a) pré-lavagem das mãos com água até aproximadamente os cotovelos; b) lavagem com detergente neutro; c) enxágüe com água em abundância; d) sanitização com água clorada a 50 mg. L^{-1} de CRT ou utilizando álcool 70 °GL; e) imersão em água clorada das mãos, braços e cotovelos periodicamente durante o processo de produção e, nos casos de interrupção desse processo, os manipuladores repetiram o procedimento de higienização.

Depois de implantado o sistema de higienização, foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas da água, ambiente, superfície de equipamentos e utensílios e manipuladores.

Constata-se, pela Tabela 11, que as características físico-químicas da água variaram dentro do esperado após a realização do procedimento de higienização do reservatório de água e a instalação do clorador por difusão. A dureza permaneceu praticamente inalterada; ocorreu aumento do pH e alcalinidade total; houve aumento considerável no teor de cloretos e, pela primeira vez, foi detectada a presença de cloro residual livre na água de uso industrial. Todas as análises encontravam-se de acordo com a legislação vigente (Portaria nº 518/MS, de 25 de março de 2004).

Tabela 11 - Análise de água de uma microindústria de laticínios antes e depois higienização do reservatório

Análise	Antes	Depois
pH	5,9	6,3
Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	15	16
Alcalinidade total (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	30	23
Acidez (mg.L^{-1} CO_2)	22	20
Cloretos (mg.L^{-1} NaCl)	4	25
Cloro residual livre (mg.L^{-1} Cl_2)		+
Mesófilos aeróbios (UFC/mL)	8,3 x 10	< 1,0 x 10^0
Coliformes totais(NMP/100 mL)	9	< 2
Coliformes fecais(NMP/100 mL)	< 2	< 2

As análises microbiológicas revelaram a boa qualidade da água após a cloração, reafirmando a importância desse procedimento no controle de microrganismos alteradores e patogênicos.

Na área de processamento da microindústria selecionada, as análises de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras encontravam-se de acordo com as especificações sugeridas após a pulverização de 100 mg. L^{-1} de cloro residual livre, realizada duas vezes por semana, com valores abaixo de 100 UFC. cm^{-2}. $semana^{-1}$, coforme Tabela 12.

Tabela 12 - Análise microbiológica do ar de ambientes de processamento de uma microindústria de laticínios

Ambientes	Mesófilos aeróbios (UFC.cm semana^{-1})	Fungos filamentosos e leveduras (UFC.cm semana^{-1})
Ambiente 1 - Pia de azulejo	$6,2 \times 10^{1}$	$6,2 \times 10^{1}$
Ambiente 2 - "Freezer"	$9,3 \times 10^{1}$	$1,1 \times 10^{2}$
Ambiente 3 - Mesa inoxidável	$8,2 \times 10^{1}$	$4,1 \times 10^{1}$
Ambiente 4 - Tanque inoxidável	$7,2 \times 10^{1}$	$7,2 \times 10^{1}$

As análises microbiológicas de mesófilos aeróbios e coliformes totais de equipamentos e utensílios encontravam-se abaixo de 50 UFC. cm^{-2}, de acordo com a Tabela 13. As contagens microbianas nas mãos de manipuladores foram em média de $5,0x10^{2}$ UFC/mão de mesófilos aeróbios e de $<1,0x10^{1}$ UFC/mão de coliformes totais.

Tabela 13 - Análise microbiológica de superfície de processamento de uma microindústria de laticínios

Equipamento/utensílio	UFC.cm^{-2}
Mesa azulejada	$< 4,0 \times 10^{1}$
Latão	$1,0 \times 10^{0}$
Formas	$1,6 \times 10^{1}$
Mesa inoxidável	$2,8 \times 10^{1}$
Pá de madeira	$1,0 \times 10^{1}$
Tanque	$1,0 \times 10^{1}$
Dessorador	$< 4,0 \times 10^{2}$

De acordo com os valores encontrados, conclui-se que os resultados foram bastante satisfatórios, revelando o sucesso do sistema de higienização implantado.

As microindústrias têm atingido relevante crescimento nos últimos anos e, no Brasil, constituem fonte importante de geração de empregos. As micro e pequenas indústrias da área de alimentos e bebidas, em Minas Gerais, representam 97,1% do total de indústrias. Esse cenário revela o interesse socioeconômico de viabilizar e dar suporte à sobrevivência dessas empresas. Verifica-se que há grande risco da produção e comercialização de alimento fora das especificações vigentes pelos órgãos competentes, colocando em perigo a saúde do consumidor.

Nesse contexto, a difusão de tecnologia gerada nas universidades e nos órgãos de pesquisa é de suma importância para a produção de alimentos com qualidade. As autoridades competentes têm cumprido seus deveres para com a sociedade ao estimular e dar suporte ao desenvolvimento de microindústrias de processamento de alimentos.

Observa-se, pelos resultados das análises realizadas, a necessidade de melhoria da qualidade nas microindústrias de processamento de leite, uma vez que

estas se mostravam em situação de risco com as elevadas contagens microbiológicas em ambientes de processamento, equipamentos e utensílios e manipuladores, havendo, assim, a necessidade de orientação técnica e de implantação de sistemas efetivos de higienização.

Conforme se esperava, em águas utilizadas nas microindústrias provenientes de poços semi-artesianos não havia a presença de cloro residual livre, o que revelou uma situação de risco, com a possibilidade de ela veicular diversos microrganismos alteradores de alimentos ou patogênicos. Portanto, é imprescindível que a água usada na microindústria seja tratada de forma correta, para mantê-la dentro dos padrões microbiológicos adequados.

Constatou-se, após a implantação do sistema de higienização, que a microbiota foi reduzida e que medidas simples e adaptadas às condições reais das microindústrias foram eficientes para solucionar ou amenizar o risco de produção de alimento que viesse causar problemas de intoxicações e infecções.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico sobre procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos**. Resolução-RDC n. 275. 2002

ANDERSEN, A. A. . New Sampler for the Collection, Sizing, and Enumeration of Viable Airborne Particles. **Journal Bacteriology**. , v. 76, p 471-484. , 1958

ANDRADE, N. J. , MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 182 p. , 1996.

ANDRADE, N. J. ; SILVA, R. M. M; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 27, p. 590-596

ANGELOTTI,R. ; WILSON, J. L. ; LITSKY,W. ; WALTER,W. G. Comparative evaluation of the cotton *Swab* and RODAC methods for the recovery of *Bacillus subtilis* spores contamination from stainless steel surfaces. **Hlth. Lab. Sci.** 1:289-296, 1964.

APHA. . **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16th ed, ed. G. H. Richardson. Am. Pub. Health Assoc. Washington, D. C. 1992

BAIRD-PARKER, A. C. An improved diagnostic and seletive medium for isolating coagulase positive staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 25, p. 12-19, 1962.

BAYLES, K. W. ; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BERGDOLL, M. S. ; REISER, R. Aplication of radioimmunoassay for detection staphylococcal enterotoxins in foods. **Journal of Food Protection** v. 43, p. 68-72, 1980.

BONETTI, F. B. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos utilizando as técnicas de RAPD e SDS-PAGE**. Campinas: UNICAMP. 1996. 79p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia de Alimentos).

BRECKINRIDGE, J. C. ; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **Medical Intelligence**, v. 284, p. 542-543, 1971.

CARDOSO, R. C. ; CHAVES, J. B. P. ;. ANDRADE, N. J. ; TEIXIERA, M. A. . . Avaliação da eficiência de agentes sanficantes para mãos de manipuladores de alimentos em serviços de alimentação. **Higiene Alimentar**, v. 10, p. 17-22, 1996

CARMO, L. S. ; BERGDOLL, M. Staphylococcal Food Poisoning in Belo Horizonte (BRAZIL). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, p. 320-323,1990.

CASMAN, E. P. ; BENNETT, R. W. Detection of staphylococcal enterotorotoxin in food. **Applied Microbiology**, USA, v. 13, p. 181-189, 1965.

COSTA, P. D. **Avaliação da técnica de ATP-bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. 2001. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

COSTA P. D. ; ANDRADE, N. J. ; SOARES, N. F. BRANDÃO, S. C. C. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37 p345-349, 2006

CRASS, B. A. ; BERGDOLL, M. S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 43-45, 1986.

DE OLIVEIRA, T. C. R. M. ; HIROOKA, E. Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim SBCTA**, São Paulo, v. 30, p. 121-131, 1996

EVANCHO, G. M. ; SVEUM, W. H. ; MOBERG, L. J. ; FRANK, J. F. Microbiological Monitoring of the Foods Processing Environment. In: DOWNES, F. P. ; ITO, K. ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food**s. 4th. Chapter. 3, p. 25-35, 2001

GRIFFITH, C. Improving surface sampling and detection of contamination. In: Lelieveld, H. L. M. Mosterte. A; Holah, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. Woodhead Publishing, Cambridge, England, Chapter 36. 588-618, 2005

HAYES, P. R. . **Food Microbiology and Hygiene**- 2nd ed. London, 515p. 1995.

HEDRICK, T. I; D. R. HELDMAN, Air Quality in Fluid and Manufactured Milk Products Plants. **Journal Milk Food Technol**. v. 32, p 265-269. 1969.

HELDMAN, D. R. Significance and Control of Airborne Contamination in Milk and Food Plants. **Journal Milk Food Technol**. v. 30, p 13-17. 1967.

HELDMAN, D. R. Factors Influencing Air-Borne Contamination of Foods. A Review. **Journal of Food Science** - v. 39, p 962-969. 1974

HYCHECK(R) slides versus Rodac(R) plates compared to the *Swab* technique for the recovery of bacteria from hard smooth surfaces. **Dairy,-Food-and-Environmental-Sanitation**. v. 14, p. 529-531 ; 1994;

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Chapman and Hall: 4th ed., Nova York. 701p, 1992.

KANG, Y. J; FRANK, F. J. , Biological Aerosols: A review of airborne Contamination and its Measurement in Dairy Processing Plants. **Journal of Food Protection**, v. 52, p 512-524. 1980.

KANG, Y. J; FRANK, F. J. , Characteristics of Biological Aerosols in Dairy Processing Plants. **Journal of Dairy Science** - v. 73, p 621-626, 1990

KIM, K. Y. ; FRANK, J. F. Effect of grwoth nutrients on attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 720-726, 1994.

LARSON, E. L. et al. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. **Food Microbiology**, v. 20, p. 735-739, 2003

LEGNANI, P. et al. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. **Food Control**. , v. 15, p. 20 -211, 2004

MERCK, 2001 a http://www. merck. com. tw/ **Microbial Air Monitoring- MAS 100 Air Sampler-Technical Information**, p. 1-2.

MERCK, 2001b http://www. merck. de/english Air Sampler MAS 100 System, p1-5. Miller,-A-J; Schultz,-F-J; Oser,-A; Hallman,-J-L; Palumbo,-S-A

PARK, C. E. ; WABURTON, D. ; LAFFEY, P. J. A Collaborative Study on the Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods with na Enzyme Immunoassay Kit (TECRA). **Journal of Food Protection**, USA, v. 59, p. 390-397, 1996.

PEREIRA, M. L. **Estafilococos Coagulase Negativos Pauciprodutores de Enterotoxinas Estafilocócias e Relato de um Surto Por Espécie Coagulase Positiva**. Campinas: Unicamp, 1996. 143p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).

RADMORE, K, W. H HOLZAPFEL, LUCK H. Proposed Guidelines for Maximum Acceptable Airborne Microorganism Levels in Dairy Processing and Packaging Plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p 91-95. 1988

REN. T. J. e FRANK,F. J. ,. Samplig of Microbial Aerosols at Various Locations in Fluid Milk and Ice Cream Plants. **Journal of Food Protection**. , v. 55, p 279-283, 1992

SCOTT,E.; BLOMFIELD,S. F.; BARLOW,C. G. ,. A comparison of contact plate and calcium alginate swab techniques of environmental surfaces. **Journal**. **Applied Bacteriology**. v. 56, p. 317-320, 1984

SILVA, C. A. S. **Avaliação da radiação ultravioleta no controle de microrganismos aderidos em filmes de polietileno de baixa densidade**. Editora UFV, Viçosa, 2000. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV)

SILVA, R. M. M. **Especificações microbiológicas para ambientes, manipuladores, equipamentos e utensílios em restaurantes industriais**. 1996. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

SIMM, E. M. **Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos na técnica de ATP-Bioluminescência**. 2004. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG

STILES, M. E. ; NG, L. K. ; Use of Baird-Parker's Medium to Enumerate *Staphylococcus aureus* in Meats. **Journal of Food Protection** v. 44, p. 583-587, 1981.

SU, Y. C. ; WONG, A. C. L. Identification and purification of new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 61, p. 1438-1443, 1995.

SULLIVAN. J. J. Air microbiology and dairy processing. **Australian Journal of Dairy Technology**,. v 34, p 133-138. , 1979.

SVEUM. W. H. ; MOBERG, L. J. ; RUDE,R. & FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Vanderzant, C. , & Splittstoeser, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd. APHA, Cap,3 p. 51-1992.

VICKERS, VT. Control of airborne contamination in dairy processing plants. N. Zeal. **Journal of Dairy Sci. Technol**. v. 21, p 89-98, 1986.

Capítulo 09

A Técnica de ATP Bioluminescência na Avaliação e no Controle de Processos de Adesão Microbiana na Indústria de Alimentos

1. Introdução
2. Uso do ATP-Bioluminescência na Avaliação da Qualidade da Água
3. Adesão Bacteriana em Superfícies de Aço Inoxidável Avaliada pela Técnica do ATP-bioluminescência
4. Condições Higiênicas de Equipamentos para a Produção de Leite Pasteurizado Avaliadas por ATP-bioluminescência
5. Adesão de Esporos de *Bacillus sporothermodurans* em Aço Inoxidável Avaliada pela Técnica do ATP-bioluminescência
6. Interferência de substâncias Orgânicas e de Microrganismos na Medida do ATP-bioluminescência
   - 6.1. Interferência de Substâncias Orgânica não-aderidas à Superfícies
   - 6.2. Interferência de Substâncias e Microrganismos Aderidos ao Aço Inoxidável AISI 304, n°4
7. Conclusão
8. Referências

Nélio José de Andrade
Roberta Torres Careli
Patrícia Dolabela Costa
Erny Marcelo Simm

Pela técnica do ATP-bioluminescência, pode-se monitorar o procedimento de higienização em tempo real e complementar as informações das análises microbiológicas.

1. Introdução

A segurança dos alimentos tem-se tornado preocupação cada vez maior, tanto para os consumidores quanto para os órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública. Como conseqüência, tem aumentado a exigência sobre as indústrias envolvidas no processamento de alimentos e bebidas, no que diz respeito aos padrões de qualidade durante a manufatura e obtenção do produto final.

A avaliação do procedimento de higienização de equipamentos e utensílios, que entram em contato direto com os alimentos, constitui preocupação constante das indústrias de alimentos, que necessitam de resultados rápidos para garantir a qualidade dos produtos processados e a segurança dos consumidores.

A redução da vida de prateleira de leite pasteurizado, por exemplo, é devida, principalmente, a microrganismos contaminantes na pós-pasteurização, como as bactérias Gram-negativas, particularmente as do gênero *Pseudomonas,* ou em virtude da presença de microrganismos resistentes ao tratamento térmico, como as espécies de *Enterococcus* e de esporulantes. A presença dessas bactérias deteriorantes em sistemas de processamento de leite deve-se geralmente a programas inadequados de limpeza e sanitização, em que resíduos de leite são deixados nas superfícies dos equipamentos, permitindo o crescimento de microrganismos contaminantes e alteradores (MURPHY et al., 1998).

Os métodos tradicionais de análises microbiológicas, como a contagem-padrão em placas, são trabalhosos, além de demorados, necessitando de um tempo de incubação de 24 a 72 h, retardando a detecção de condições sanitárias insatisfatórias e contaminações microbianas que podem afetar a segurança dos produtos (KENNEEDY; OBLINGER, 1985). Além disso, esses métodos não detectam a presença dos resíduos que permanecem nas superfícies após a higienização, os quais são fontes de contaminação de alimentos e diminuem a eficiência dos sanitizantes.

Para atender às necessidades das indústrias de alimentos, têm sido desenvolvidos métodos rápidos para enumeração de microrganismos e detecção de resíduos orgânicos (KENNEEDY; OBLINGER, 1985; HAWRONSKYJ; HOLAH, 1997; HOLAH et al., 2005). Dentre esses métodos rápidos, encontram-se aqueles que se fundamentam nos conceitos de biofísica ou no crescimento e metabolismo microbiano, na radiometria, nas medidas de impedância, na microcalorimetria e na medição da

bioluminescência. Este último tem como princípio a determinação da quantidade de ATP presente sobre as superfícies avaliadas, seja este de origem microbiana ou não (KENNEEDY; OBLINGER, 1985; GIESE, 1991; GRIFFITHS, 1993; TYDRICH, 1996).

A técnica da bioluminescência pode gerar resultados em minutos, e um laboratorista consegue analisar 20 a 30 amostras por hora, dependendo dos equipamentos e método utilizados (CROMBRUGGE; WAES, 1991ab).

Na Figura 1 é mostrado um tipo de equipamento utilizado nessa técnica.

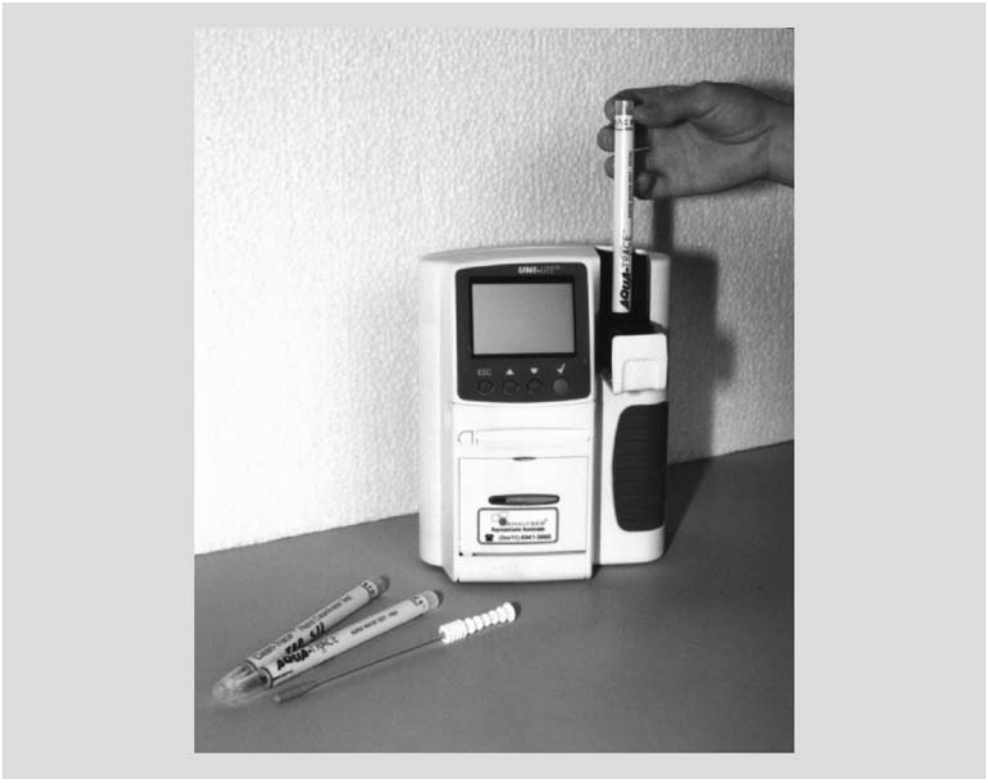


Figura 1 - Equipamento utilizado na técnica do ATP-bioluminescência (Biotrace).

Várias informações são fundamentais para o uso e o entendimento correto da técnica do ATP-bioluminescência (COMBRUGGE; WAES, 1991a; TYDRICH, 1996; BARRICHELLO; ALLIL, 1997). Todas as células vivas contêm moléculas de adenosina trifosfato (ATP), incluindo as da pele, do sangue, de plantas e de microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, tornando possível a detecção desses agentes quando presentes nos equipamentos e utensílios.

O ATP é um nucleotídeo utilizado pelos microrganismos como fonte de energia, desaparecendo depois de 2 h após a morte da célula e sendo sua quantidade por célula geralmente constante. O uso de ATP para medir a qualidade bacteriológica está fundamentado no fato de todas as células vivas conterem ATP, o que não ocorre com as células não viáveis. Cada bactéria contém, em média, 1 fentograma (10^{-15} g) de ATP, podendo variar de 0,1 a 5,5. Dentre as várias razões para a variação desse conteúdo entre as bactérias, encontra-se a fase do crescimento celular, pois na estacionária se observa o mais baixo conteúdo. Além disso, o conteúdo intracelular de ATP pode diminuir em resposta a alguma condição de estresse, por exemplo limitação de nutrientes, alterações no pH e presença de inibidores, e a quantidade desse nucleotídeo depende da forma de extração. O ATP, às vezes, está presente em uma variedade de alimentos, podendo ser de origem microbiana ou não.

Uma limitação do método é a necessidade de um número mínimo de microrganismos na amostra, para que o ATP seja detectado. Apenas contagens acima de 10^4-10^5 UFC por mililitro ou grama originam quantidade detectável do nucleotídeo (ADAMS; HOPE, 1989).

O método descrito por Stannard e Wood (1983) produziu resultados em 20-25 min; tempo esse considerado curto, se comparado com 24-48 h necessárias para uma contagem convencional de colônias. Nesse experimento, amostras de carne fresca foram analisadas, e o método mostrou uma estimativa da população microbiana, quando o alimento apresentava contagens acima de 10^5 UFC.g^{-1}.

A técnica de ATP-bioluminescência foi utilizada com sucesso para detectar o ATP em superfícies de equipamentos usados em cirurgias orais na área odontológica, como um indicador da presença de contaminação por saliva ou microrganismos, e avaliar a eficiência dos procedimentos de rotina de higienização. Tais rotinas são difíceis de serem monitoradas, em razão do tempo e do trabalho despendido na realização das técnicas microbiológicas. Esse monitoramento é vital no controle de infecções cruzadas, ou seja, de um paciente para outro ou, então, para as pessoas envolvidas na cirurgia, como os dentistas e seus auxiliares. A atenção sobre o controle de contaminação cruzada em cirurgia oral aumentou principalmente com o advento da AIDS (HIV), embora outra grande preocupação seja referente ao vírus da hepatite B (HBV), presentes não somente no sangue, mas também em secreções como a saliva. Embora a maior preocupação com a transmissão do HIV e HBV durante as cirurgias orais seja relacionada aos acidentes perfurocortantes, a transmissão envolvendo superfícies contaminadas não pode ser descartada (DOUGLAS; ROTHWELL, 1991).

O princípio da técnica do ATP-bioluminescência consiste em quantificar ATP presente em uma superfície ou em uma amostra líquida, utilizando-se *Swabs* apropriados.

Na Figura 2, é mostrada a técnica para remoção de ATP na superfície de equipamentos e utensílios, indicando a forma de aplicar o *Swab*, o ângulo e movimento circular do *Swab*, a área e a forma diagonal para a coleta.

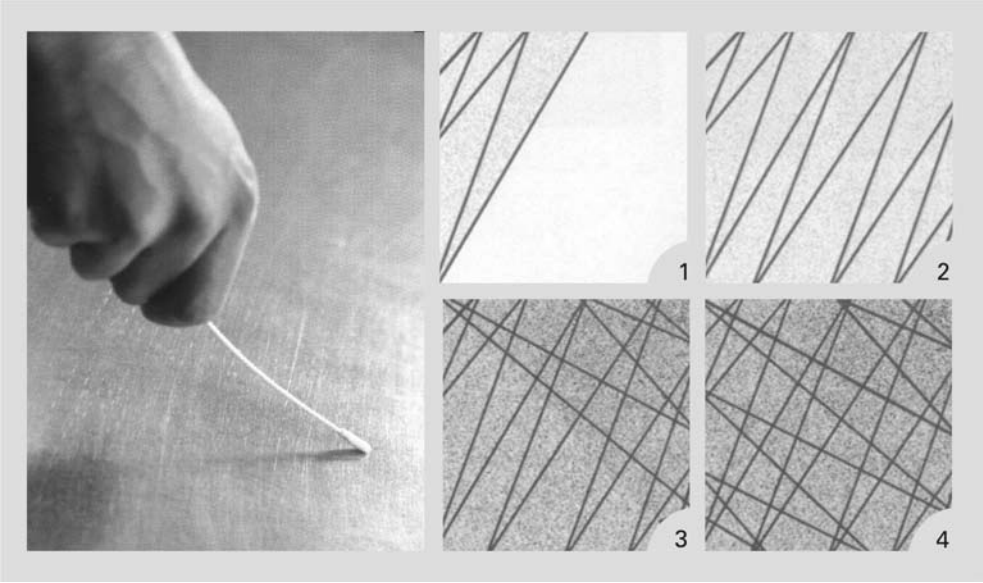


Figura 2 - Técnica adequada para remoção de ATP na superfície de equipamentos e utensílios, mostrando a forma de segurar o *Swab*, o ângulo de contato, a área (10 cm x 10 cm) e a coleta em diagonal.

O ATP coletado reage com o complexo luciferina/luciferase, extraído da cauda do vaga-lume da espécie *Photinuis pyralis* ou de peixes abissais (GIESE, 1991; GRIFFITHS, 1993; VELAZQUEZ; FEIRTAG, 1997). A enzima luciferase utiliza a energia química contida na molécula de ATP para promover a descarboxilação oxidativa da luciferina, resultando na emissão de luz, ressaltando-se que para cada ATP um fóton de luz é emitido. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de ATP presente coletada na superfície dos equipamentos e utensílios (GIESE, 1991; HAWRONSKYJ; HOLAH, 1997), conforme esquema mostrado na Figura 3:

$$\text{Luciferina} + \text{ATP} + O_2 \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Luciferase}} \text{Oxiluciferina} + \text{AMP} + CO_2 + \text{Luz}$$

Figura 3 - Esquema da reação entre a adenosina trifosfato (ATP) e o complexo luciferina/luciferase.

A medida de ATP pelo método da bioluminescência é afetada por certos fatores que causam redução na emissão dos fótons de luz. Essa reação acontece em pH ótimo de 7,75. Quando o pH está abaixo ou acima desse valor pode ocorrer diminuição na produção de luz. A temperatura ótima da reação é de 25 °C, e em temperaturas mais elevadas a luciferase pode ser inativada, enquanto em tempera-

turas mais baixas a velocidade da reação diminui. A turbidez e a cor das amostras, por exemplo no caso de análise de água, também causam diminuição na produção de luz (COMBRUGGE; WAES, 1991a; TYDRICH, 1996).

Os instrumentos disponíveis para medir a luminescência são os fotômetros sensíveis à emissão de luz. Relativamente simples, baseiam-se na detecção de luz por fotomultiplicadores. A amostra é colocada em uma câmara escura, para que o fotomultiplicador e o amplificador sejam protegidos da luz externa. Os resultados são usualmente dados em unidades relativas de luz (URL) ou em logaritmos decimais das unidades relativas de luz ($\log_{10}$URL) (COMBRUGGE; WAES, 1991a; HAWRONSKYJ; HOLAH, 1997).

A técnica de ATP-bioluminescência tem sido utilizada para determinar a qualidade microbiológica de produtos alimentícios, como leite e derivados, bebidas, vegetais e carnes e derivados; para avaliar a qualidade da água de abastecimento público e no processo de limpeza e desinfecção, tanto em indústria de alimentos quanto em hospitais e indústria farmacêutica (KENNEDY; OBLINGER, 1985; GRIFFITHS, 1993; TYDRICH, 1996; VELAZQUEZ; FEIRTAG, 1997; GOMEZ, 1999; CORBITT et al., 2000; GRIFFITHS et al., 2000). Atualmente, há vários fabricantes desses equipamentos, e muitos deles são comercializados no Brasil. Alguns estudos têm mostrado as diferenças na sensibilidade e reprodutibilidade desses aparelhos.

De acordo com Hawronskyj e Holah (1997) e Tydrich (1996), quanto à técnica do ATP-bioluminescência, algumas vantagens e desvantagens podem ser citadas (Quadro 1).

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens da técnica de ATP-bioluminescência

ATP-bioluminescência	
Vantagens	Capaz de detectar microrganismos e resíduos de alimentos Técnica simples, fácil de usar, uma vez que se exige menos trabalho de laboratório Pode ser usada como ferramenta de treinamento para demonstrar a ocorrência de contaminação na superfície, seja de origem orgânica, seja microbiológica. A verificação imediata de uma boa higienização em uma superfície pode ter efeito positivo na motivação e "performance" das pessoas envolvidas nesse processo
Desvantagens	Não é capaz de detectar a presença ou ausência de microrganismos patogênicos Apenas partes acessíveis dos equipamentos podem ser analisadas. A presença de detergentes e outros agentes químicos podem interferir na reação de bioluminescência O custo da aplicação da técnica ainda é elevado para pequenas indústrias

A principal vantagem do monitoramento dos níveis de ATP sobre as técnicas convencionais de cultivo de microrganismos é a rapidez na obtenção dos resultados. Em alguns casos, são necessários dias para a finalização de métodos de cultivo, enquanto a análise de ATP requer apenas alguns minutos. Assim, programas de higienização podem ser monitorados em tempo real, e, se os níveis de ATP encontrados estiverem acima dos limites preestabelecidos como aceitáveis, uma nova higienização do ponto amostrado deve ser iniciada imediatamente.

O uso da análise de ATP para monitorar níveis de higienização não deve substituir as técnicas tradicionais, que são utilizadas para detectar microrganismos específicos, podendo servir como análise complementar nesse tipo de monitoramento (COLQUHOUN et al., 1998).

A determinação de ATP microbiano depende da eficiência da separação entre bactéria e os resíduos orgânicos. Após a separação, seguem-se a extração e a medida do ATP microbiano. Pode-se usar também a extração seletiva e a destruição enzimática do ATP não-microbiano, seguida pela extração e medida do ATP microbiano. Esses tipos de reagentes, disponíveis comercialmente, podem ser encontrados sob as seguintes denominações: NRS®, Lumac e NAS® (STANNARD; WOOD, 1983; KENNEDY; OBLINGER, 1985; GIESE, 1995; TYDRICH, 1996). Alguns pesquisadores têm aplicado filtração ou centrifugação para separar os microrganismos da amostra do alimento, medindo, assim, apenas o ATP microbiano.

Green et al. (1999) avaliaram o efeito de nove agentes químicos de limpeza e sanitizantes comerciais na medida de ATP-bioluminescência, usando ATP de duas diferentes fontes: ATP puro, conseguido diretamente do fabricante do equipamento de leitura; e ATP de fonte orgânica, obtido de exsudato de carcaças de frango. Os agentes químicos foram preparados nas seguintes concentrações: 10% da concentração recomendada pelo fabricante; de acordo com a recomendada e duas vezes essa concentração. Os resultados de cada agente químico foram apresentados em porcentagem, considerando-se o valor do logaritmo decimal das unidades relativas de luz (URL) do controle como 100%. Excetuando-se o teste com quaternário de amônio, todos os outros agentes químicos reduziram os valores de URL. Para o quaternário de amônio, o efeito foi inverso, ou seja, os resultados da leitura foram maiores que o controle nas duas fontes de ATP. O peróxido de hidrogênio acidificado causou maior redução na medida de URL para o ATP de fonte orgânica do que para o ATP puro. Para acidificar esse agente, utilizou-se o ácido acético, e a ação deste com a matéria orgânica, proteínas e lipídeos talvez tenha sido a responsável pela redução nos valores de URL. Esses autores concluíram que a exposição dos componentes da reação de bioluminescência, como a enzima luciferase, o co-fator luciferina ou o substrato ATP, aos sanitizantes e agentes de limpeza pode acarretar alterações nas medidas de URL.

Velazquez e Feirtag (1997) avaliaram alterações na medida de URL causadas pelas seguintes soluções sanitizantes: i) hipoclorito de sódio comercial nas concentrações de 100 a 50.000 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre (CRL), com pH variando de 7,2 a 12,1; e ii) 5 a 800 $mg.L^{-1}$ de um composto quaternário de amônia com pH entre 5,8 e 6,3. Essas soluções foram adicionadas em amostras contendo 10^8 $UFC.mL^{-1}$ de *Escherichia coli* O157:H7. Os resíduos da concentração de 100 $mg.L^{-1}$ de CRL causaram ligeiro aumento na medida de URL, não sendo, no entanto, detectadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as medidas de URL obtidas das amostras que continham 500 e 1.000 $mg.L^{-1}$ de CRL e as medidas determinadas para o controle. Os resíduos das concentrações de 10.000 a 50.000 $mg.L^{-1}$ de CRL fizeram que a medida de URL fosse reduzida. Já as soluções sanitizantes de quaternário de amônia provocaram aumento de 10 % nessa medida.

Demonstrou-se, em um ensaio microbiológico utilizando a técnica de ATP-bioluminescência, o potencial de uso dessa metodologia como forma de detectar contaminação fecal em carcaças bovinas e para medir a efetividade do processo de descontaminação. Assim, a técnica pode ser usada para monitorar pontos críticos de controle em um programa de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em uma planta de processamento de carnes bovinas (SIRAGUSA; CUTTER, 1995). A combinação de programas de APPCC e métodos microbiológicos rápidos como o ATP-bioluminescência pode ajudar as indústrias a encontrar novos caminhos para processar alimentos de forma mais eficiente e com maior segurança.

Várias pesquisas têm sido realizadas com a técnica de ATP-bioluminescência, e sínteses de algumas delas são apresentadas subseqüentemente.

2. Uso de ATP-Bioluminescência para Avaliar a Qualidade da Água

Inicialmente, amostras de água:i) de manancial; ii) floculada; iii) decantada; iv) filtrada, coletadas de uma Estação de Tratamento de Água (ETA); v) água destilada; vi) água industrial; vii) água gelada pasteurizada; viii) água de resfriamento de amônia; e ix) vapor condensado, coletadas de uma indústria de laticínios, foram avaliadas por Costa (2001, 2006) quanto aos seus aspectos físicos, químicos e microbiológicos.

Avaliado o conjunto de características físico-químicas e microbiológicas das diversas amostras, decidiu-se pelo uso das seguintes águas: de manancial, de resfriamento de amônia e da industrial para realização dos testes com a técnica da bioluminescência, por serem as que apresentaram maiores diferenças nas características avaliadas. Posteriormente, as amostras selecionadas foram

novamente submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas e também à técnica de ATP-bioluminescência, usando-se o Kit Aquatest Total (BIOTRACE, 2000), para determinação, do ATP livre mais o microbiano; e Kit Aquatest Free, para determinação, do ATP livre, ou seja, de origem não-microbiana. Os resultados dessas análises são apresentados nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Análises físico-químicas de águas originárias do tratamento convencional de Estação de Tratamento de Água e de uso em indústria de laticínios

Análises físico-químicas						
Amostras de água	Turbidez (UT)*	pH	Acidez ($mg.L^{-1}$)**	Alcalinidade ($mg.L^{-1}$)***	Cloretos ($mg.L^{-1}$)****	Dureza ($mg.L^{-1}$)***
Manancial	10,8	6,9	7,2	54,4	11,9	51,5
Resfriamento de amônia	5,8	8,5	0,0	278,6	163,7	251,7
Industrial	0,9	6,7	7,4	56,5	15,2	54,6

* Unidade de turbidez. ** expressa em CO_2 *** expressa em $CaCO_3$ **** expressa em NaCl

Quadro 3 - Análises microbiológicas de águas originárias do tratamento convencional de Estação de Tratamento de Água e de uso em indústria de laticínios

Análises microbiológicas		
Amostras de água	Aeróbios mesófilos ($UFC.mL^{-1}$)	Coliformes totais ($NMP.100\,mL^{-1}$)
Industrial	$2{,}70 \times 10^{0}$	< 2
Resfriamento de amônia	$2{,}50 \times 10^{3}$	90
Manancial	$6{,}50 \times 10^{2}$	400

Os resultados das análises para as amostras de água de manancial foram comparados aos padrões exigidos pela Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005), podendo afirmar que os parâmetros avaliados se encontram dentro da legislação vigente. Da mesma forma, puderam-se comparar os resultados das análises da água industrial já tratada da ETA/UFV com os padrões estabelecidos pela Portaria n° 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004), que trata da qualidade de água potável, constatando-se que a água se encontrava dentro do padrão legal vigente para os parâmetros avaliados: aeróbios mesófilos e coliformes totais. No entanto, deve-se salientar que há exigência da análise de cerca de 90 parâmetros diferentes para determinar se um manancial se encontra em condições de potabilização (Resolução n° 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente) ou se a água é potável (Portaria n° 518, do Ministério da Saúde).

A seleção das amostras fundamentou-se no fato de que se procuraram selecionar aquelas que apresentassem diferenças bem caracterizadas em seus aspectos físicos, químicos e, ou, microbiológicos. A água de manancial mostrou valores elevados de turbidez e de contagens de aeróbios mesófilos e coliformes totais. Já na água de resfriamento de amônia, notaram-se concentrações elevadas em todos os parâmetros avaliados. A água industrial pode ser considerada uma amostra-controle, em razão de suas boas características físico-químicas e microbiológicas.

Para a avaliação da qualidade microbiológica da água, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e três tratamentos, e, a partir das análises de variância do $\log_{10}$ de URL e UFC.cm^{-2} , foram comparadas as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se, pela análise de variância da quantidade de ATP total, livre e microbiano e também das contagens de aeróbios mesófilos e de coliformes totais das amostras de água avaliadas (Quadro 4) que houve diferença significativa ($p < 0,05$).

Quadro 4 - Resumo das análises de variância dos logaritmos decimais (log_{10}) da concentração de Unidades Relativas de Luz (URL) do ATP total, livre e microbiano, de UFC.mL^{-1} de mesófilos aeróbios e de NMP.100 mL^{-1} de coliformes totais de amostras de água de manancial, resfriamento de amônia e industrial

		Quadrado médio (QM)				
FV	GL	ATP Total	ATP Livre	ATP Microbiano	Aeróbios mesófilos	Coliformes Totais
Tratamento	2	0,404**	0,194*	1,777**	14,68**	5,993**
Resíduo	6	0,030	0,028	0,105	0,053	0,124

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F **Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Verifica-se, conforme o Quadro 5, que as amostras de água de manancial e de resfriamento de amônia não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$), pelo teste de *Tukey*, para as quantidades de ATP total e livre e também para as contagens microbianas. Verifica-se, ainda, como esperado, que a amostra de água industrial foi aquela que apresentou a menor concentração dos diferentes tipos de ATP avaliados e as menores contagens microbianas.

Quadro 5 - Média da concentração dos logaritmos decimais (Log_{10}) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e microbiano, de UFC.mL^{-1} de mesófilos aeróbios e de NMP.100 mL^{-1} de coliformes totais de amostras de água de manancial e resfriamento de amônia e industrial. Média de três repetições

Amostras de água	ATP Total (logURL)	ATP Microbiano (logURL)	ATP Livre (logURL)	UFC.mL^{-1}	NMP.100mL^{-1}
Resfriamento de amônia	2,47 a	1,92 a b	2,31 a	4,23 a	2,38 a
Industrial	1,97 b	1,22 b	1,86 b	0,33 b	0,30 b
Manancial	2,69a	2,47 a	2,28 a	4,09 a	3,00 a

* Médias, com mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Em relação à água industrial, houve a concordância entre os métodos de bioluminescência e de contagem de aeróbios mesófilos e coliformes totais. Para a técnica da bioluminescência, o fabricante (BIOTRACE, 2000) recomenda valores menores que 150 URL, cujo $\log_{10}$ corresponde a 2,18, para que a água seja considerada em condições higiênicas satisfatórias. Independentemente da origem do ATP, os valores se encontravam abaixo do recomendado. Deve-se ressaltar, entretanto, que essa técnica não diferencia as espécies microbianas contaminantes. Os resultados das análises microbiológicas de aeróbios mesófilos e coliformes totais estão dentro dos padrões legais vigentes (BRASIL, 1990, 2005).

No que se refere à água do manancial, observou-se que as concentrações de ATP total e livre eram mais elevadas do que as obtidas na água utilizada na indústria. Já as características microbiológicas, de turbidez e de cor diferenciaram essas amostras. Comparando-se as três amostras avaliadas, as concentrações de ATP total e microbiano foram as mais elevadas na água de manancial e consistentes com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos e coliformes totais. Os resultados das análises pela técnica de ATP-bioluminescência sugeriram que a água do manancial encontrava-se em condições insatisfatórias, acima de 300 URL para ATP total, e em condições de alerta entre 150 e 300 URL, para o ATP livre e microbiano. De acordo com os resultados, a determinação do ATP total é a recomendada para avaliar a qualidade microbiológica da água de manancial e, nesse caso, não é um problema considerável o fato de a técnica não diferenciar espécies microbianas, já que a água receberá tratamentos, como sedimentação com coagulantes, floculação, filtração e cloração, para o controle da turbidez e o controle microbiológico.

Conforme a Resolução n° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005), apesar da concentração relativamente elevada de coliformes totais, os valores encontrados estão dentro dos padrões legais exigidos para água a ser potabilizada.

A água de resfriamento de amônia foi selecionada em razão das diferenças consideráveis em suas características físico-químicas e microbiológicas, em relação às outras amostras. Essa água foi considerada em situação de alerta para a determinação de ATP total e livre e em boas condições de higiene para determinação do ATP microbiano. Também, nesse caso, os resultados indicaram que a determinação de ATP total foi a mais recomendada. Talvez a qualidade físico-química da água tenha influenciado a determinação da bioluminescência, diminuindo a formação de luz. Essa água apresentou valores elevados de turbidez, pH, alcalinidade, cloretos e dureza.

Pesquisas mostram que diversas substâncias detergentes e sanitizantes afetam a técnica da bioluminescência. De acordo com a literatura, os sanitizantes causam reduções nas medidas de ATP quando entram em contato direto com os reagentes da bioluminescência, podendo levar a uma falsa conclusão de que os equipamentos de processamento estão corretamente sanitizados, quando na verdade o sanitizante pode ter reduzido a leitura de URL.

3. Adesão Bacteriana em Superfícies de Aço Inoxidável Avaliada pela Técnica de ATP-bioluminescência

No Quadro 6 é sintetizado outro experimento de Costa (2001), que trata da avaliação e adesão microbiana em superfícies de aço inoxidável e polietileno pela técnica da bioluminescência.

Quadro 6 - Síntese de pesquisa sobre adesão microbiana em superfícies avaliadas pela técnica de ATP-bioluminescência

Microrganismos	Esporos de *Bacillus sporothermodurans* e *Escherichia coli* K 12
Superfícies	Aço inoxidável Polietileno (somente para esporos de *Bacillus sporothermodurans*)
Análise dos resultados	Na avaliação do processo de adesão nas diferentes superfícies, utilizou-se a análise descritiva dos log_{10} de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) e log_{10} de URL (Unidades Relativas de Luz)
Técnica	ATP-bioluminescência

Fonte: Costa, 2001.

A relação entre as avaliações do processo de adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* pelos processos de contagem em placas e a técnica de bioluminescência, em superfícies de aço inoxidável e de polietileno de baixa densidade (PEBD), é mostrada no Quadro 7.

Quadro 7 - Logaritmo decimal (log_{10}) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total e UFC.cm^{-2} em superfícies de aço inoxidável e polietileno aderidas com esporos de *Bacillus sporothermodurans*

Superfície	UFC.mL^{-1} na suspensão	UFC.cm^{-2}	Log_{10} UFC.cm^{-2}	URL	Log_{10} URL
Aço inoxidável	$1,0x10^4$	$3,67 x10^2$	2,55	71	1,85
Polietileno	$6,7 x10^5$	$4,2 x10^4$	4,2	94	1,97

De acordo com a técnica da bioluminescência, as superfícies poderiam ser consideradas, em condições higiênicas satisfatórias, pois todos os resultados se encontravam abaixo de 150 URL (log_{10}<2,18). Porém, quando avaliadas pela contagem-padrão em placas, as superfícies foram classificadas como inadequadas para o processamento de alimentos. Considerando que para a APHA (DOWNES; ITO, 2001) uma superfície higienizada deve apresentar até 2 UFC.cm^{-2} (log_{10} de 0,3) e que outras instituições como a OMS e OPAS sugerem até $5,0x10^1$ UFC.cm^{-2} (log_{10} de 1,7), os resultados da avaliação pela microbiologia tradicional indicaram superfícies inadequadas para o processamento de alimentos.

Nas condições deste experimento, a técnica da bioluminescência não foi apropriada para avaliar a presença de esporos de *B. sporothermodurans* em ambas as superfícies. Esses resultados são compatíveis com várias pesquisas disponíveis na literatura, sendo uma provável explicação o fato de os esporos bacterianos não apresentarem metabolismo, quantidade de ATP ou transporte de elétrons detectáveis, não

tendo, portanto, energia suficiente para a reação da formação de luz. Assim, quando expostos ao complexo enzimático luciferina/luciferase, produzem muito menos luz, expressa em URL, quando comparado com o resultado observado em células vegetativas (BAKER et al., 1992).

Em relação à quantidade de esporos aderidos, constatou-se que houve maior adesão em polietileno que no aço inoxidável. A adesão microbiana em superfícies está associada a diversos fatores, que inter-relacionados determinam a quantidade de microrganismos aderidos (ZOTTOLA, 1997), incluindo entre eles a carga elétrica e a hidrofobicidade, que poderiam estar influenciando essa maior adesão ao polietileno. Os processos de adesão também podem ter influenciado a quantidade de esporos aderidos; no caso de cupons de aço inoxidável, a técnica consistiu na imersão em suspensão de esporos, enquanto no de cupons de polietileno a suspensão foi adicionada no interior de uma embalagem feita com o polímero.

Observou-se, pelos resultados, que os esporos de *B. sporothermodurans* têm a capacidade de aderir às superfícies avaliadas, e essa adesão é afetada pelo número inicial de esporos na suspensão. No aço inoxidável, a adesão foi de 2,42 % e 3,57 % quando os números de esporos na suspensão eram da ordem de 10^4 UFC.mL^{-1} e 10^6 UFC.ml^{-1}, respectivamente. No polietileno, a adesão dos esporos atingiu 9,9 % e 17,4 %, respectivamente, considerando-se os mesmos números de esporos nas suspensões usadas no processo de adesão. Constatou-se, como esperado, que o número de esporos aderidos aumentou com a concentração destes nas suspensões.

Observa-se, pelo Quadro 8, que a determinação das URL é afetada pelas condições de adesão de *E. coli*. Constatou-se que a suspensão microbiana centrifugada associada ao tempo de repicagem do microrganismo interferiu na avaliação pela técnica da bioluminescência e também na quantidade de células aderidas. Determinaram-se os valores de 113 URL para ATP total e 5,9x10^2 UFC.cm^{-2} de células aderidas ao aço inoxidável, quando a suspensão foi centrifugada e o tempo de repicagem, de 24 h. Sem a centrifugação e com 12 h de repicagem, os valores foram de 2397 URL e 1,1x10^4 UFC.cm^{-2}.

Quadro 8 - Logaritmo decimal (log_{10}) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e microbiano e UFC.cm^{-2} presentes em superfícies de aço inoxidável com suspensão de *Escherichia coli* K12

Condições de adesão	Tipo de ATP	UFC.cm^{-2}	Log_{10}	URL	Log_{10}
Centrifugada, intervalo de repicagem de 24 h e tempo de adesão de 24 h	Total	5,9 x10^2	2,77	113	2,05
Não-centrifugada, intervalo de repicagem de 12 h e tempo de adesão de 24 h	Total	1,1 x10^4	4,02	2397	3,38
	Livre	Nd	Nd	892	2,95
	Microbiano	Nd	Nd	1500	3,18

nd, Não determinado.

A literatura apresenta possíveis explicações para esse resultado. Crombrugge e Waes (1991a) mostraram que ocorre diminuição na quantidade de ATP durante o crescimento celular, havendo baixo conteúdo dele na fase estacionária, em relação às outras fases do desenvolvimento microbiano. Mudanças na taxa metabólica afetam o nível de ATP celular, e, conseqüentemente, situações subótimas e de estresse podem alterar o conteúdo de ATP. Além disso, as formas diferentes de extração, usadas neste experimento, ou seja, a filtração e a centrifugação, podem levar à situação de estresse e, logicamente, a uma diminuição no nível do ATP celular. É provável, ainda, que o estado fisiológico das células microbianas repicadas após intervalos de 12 h de incubação fosse diferente daquelas células repicadas após intervalos de 24 h de incubação, e no intervalo de repicagem menor as células estavam na fase logarítmica de crescimento e no maior, não. Esse fato, associado à presença de nutrientes nas células não-centrifugadas, aumentou o número de células aderidas na superfície após 24 h, o que pode ser observado pelos resultados do ATP microbiano, que atingiu 1.500 URL. A quantidade de ATP microbiano foi cerca de 13 vezes maior que o ATP total para células centrifugadas e com repicagens de 24 h (Quadro 8).

Observou-se pelos resultados que nas células centrifugadas a quantidade de ATP total determinada pela técnica da bioluminescência atingiu apenas 113 URL, o que sugere que a superfície está em condições higiênicas adequadas. Já a técnica de contagem em placas revelou condições higiênicas insatisfatórias, pois o $\log_{10}$ do número de células aderidas por cm^2 atingiu 2,77. Nas células não-centrifugadas, os métodos apresentam respostas semelhantes para o ATP total, ambos sugerindo que a superfície está em condições higiênicas insatisfatórias, com 2.397 URL e $\log_{10}$ do número de células aderidas por cm^2 igual a 4,0. Concluiu-se, assim, que na interpretação dos resultados da técnica da bioluminescência para avaliar a adesão microbiana devem ser consideradas, dentre outros fatores, as diferentes condições experimentais e a população microbiana.

A maior adesão às células não-centrifugadas se deveu, provavelmente, ao fato de os nutrientes do meio de cultura auxiliarem nesse processo, além de facilitarem o crescimento microbiano, com provável produção de exopolissacarídeos, após o período de 24 h, partindo de uma cultura com intervalos de 12 h entre repicagens. As porcentagens de adesão das células de *E. coli* K12 foram de 0,0012% e 0,068%, respectivamente nas células centrifugadas e não-centrifugadas.

4. Condições Higiênicas de Equipamentos para a Produção de Leite Pasteurizado Avaliadas por ATP-bioluminescência

A técnica do ATP bioluminescência como alternativa à contagem microbiana para avaliar o procedimento de higienização de superfícies de aço inoxidável de equipamentos de uma indústria de laticínios foi estudada.

O Quadro 9 apresenta a síntese de uma pesquisa acerca do procedimento de higienização de equipamentos de uma linha de pasteurização de leite pelas técnicas da bioluminescência e contagem de aeróbios mesófilos.

Quadro 9 - Síntese de pesquisa sobre procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite pelas técnicas da bioluminescência e contagem-padrão em placas

Equipamentos	Caminhão-tanque (CAT) Tanque de resfriamento de leite cru (TRC) Tanque de equilíbrio (TEP) Desnatadeira (DES) Tanque de armazenamento de leite pasteurizado (TLP) Tanque de equilíbrio para empacotamento de leite pasteurizado (TEL)
Análise dos resultados	Para a avaliação do procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Os resultados foram avaliados pela análise de variância seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade
Técnica	ATP-bioluminescência Contagem-padrão em placas

Fonte: Costa, 2001, 2006

Tanto a quantidade de ATP quanto o número de microrganismos foram diferentes ($p<0,05$) quando se compararam os resultado antes (9772 URL e 1,20 $x10^3$ UFC.cm^{-2}) e depois (2511 URL e 1, 10$x10^1$ UFC.cm^{-2}) do procedimento de higienização.

Os resultados indicaram que não há uma concordância entre os métodos de contagem microbiana e ATP-bioluminescência na classificação das condições higiênicas dos equipamentos avaliados para o processamento de leite (Quadros 10 e 11). Observa-se, nesses quadros, que para ambas as técnicas de avaliação do procedimento de higienização, as superfícies da DES e do TRC foram aquelas que se apresentaram em piores condições higiênicas. No entanto, não houve uma concordância entre as duas técnicas na classificação das condições higiênicas das demais superfícies. Pode-se dizer que não houve relação direta entre URL e UFC.cm^{-2}. Portanto, a técnica de ATP-bioluminescência apenas pode ser usada como indicadora das condições higiênicas associadas às quantidades de matéria orgânica nas superfícies, ou seja, se o procedimento de higienização foi efetuado corretamente ou não. Essa informação é importante, pois a presença de resíduo de alimentos nas superfícies pode originar processos de adesão microbiana e formação de biofilmes (ZOTTOLA, 1997). No expe-

rimento, o número de microrganismos aderidos indicou que ocorreu adesão bacteriana, atingindo cerca de 10^4 UFC.cm^{-2}, e não formação de biofilmes.

Quadro 10 - Log_{10} de Unidades Relativas de Luz (URL) em diferentes superfícies de uma indústria de alimentos antes e depois do procedimento de higienização. Média de três repetições

Superfícies	Médias	
	Antes	Depois
Tanque de leite cru resfriado (TRC)	4,60 Aa	3,95 Aa
Desnatadeira (DES)	4,51Aa	4,50A a
Caminhão-tanque (CAT)	4,07Aa	4,07Aa
Tanque de empacotamento de leite (TEL)	3,70Aa	3,71A a
Tanque de armazenamento de leite (TLP)	3,61Aa	3,70 Aa
Tanque de equilíbrio do pasteurizador (TEP)	3,45Aa	3,06 Aa

* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Quadro 11 - Log_{10} de mesófilos aeróbios (UFC.cm^{-2}) em diferentes superfícies de uma linha de circulação de leite

Superfícies	Médias	
	Antes	Depois
Desnatadeira (DES)	3,59 Aa	2,21Ba
Tanque de leite cru resfriado (TRC)	3,49Aa	2,18Ba
Tanque de equilíbrio para empacotamento de leite (TEL)	3,20Aa	-0,43Bb
Tanque de armazenamento de leite pasteurizado (TLP)	3,03Aa	-0,17Bb
Tanque de equilíbrio do pasteurizador (TEP)	2,72Aa	1,21 Bab
Caminhão-tanque (CAT)	2,72Aa	-0,96Bb

* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados evidenciaram, ainda, que o número médio de aeróbios mesófilos nas superfícies encontrava-se acima de 2 UFC.cm^{-2} (log_{10}>0,3), conforme recomendação da APHA (DOWNES; ITO, 2001), mas que algumas superfícies atendiam à recomendação de outros órgãos, como OMS e OPAS, que sugerem que superfícies contendo até 50 UFC.cm^{-2} (log_{10}<0,7) podem ser consideradas adequadamente higienizadas. Assim, pode-se concluir que as superfícies após a higienização estavam em condições higiênicas adequadas, se for usada uma especificação menos rígida do que a proposta pela APHA. No entanto, as superfícies estavam em condições higiênicas insatisfatórias quando a avaliação foi pela técnica do ATP total, que determinou a concentração de 2.511 URL, muito acima de 150 URL (log_{10} > 2,17) recomendados pela BIOTRACE (2000), fabricante do equipamento de ATP-bioluminescência usado neste experimento.

Outra maneira de comparar as técnicas de contagem de aeróbios mesófilos e a de bioluminescência é pela porcentagem de superfícies higienizadas que atendem às recomendações da APHA, da OMS em relação à contagem de aeróbios mesófilos e que satisfazem a recomendação da técnica de ATP-bioluminescência.

Verifica-se, pelo Quadro 12, que pela técnica da bioluminescência 100 % das superfícies foram consideradas em condições higiênicas insatisfatórias, depois de realizada a higienização. A contagem microbiana detectou 50 % de superfícies em condições higiênicas insatisfatórias, considerando-se a recomendação da APHA e a da OMS, 28 %.

Verificou-se, pelos resultados, que a técnica de ATP-bioluminescência apresenta resultados diferentes dos métodos de contagem bacteriana, sugerindo a influência de resíduos, oriundos da má higienização sobre a medida da quantidade de ATP total nas superfícies.

Quadro 12 - Porcentagem de superfícies de processamento de leite em boas condições de higiene, conforme especificações propostas por entidades internacionais ou pelo fabricante do equipamento Unilite (ATP-bioluminescência)

Entidade ou Fabricante	Especificações	Porcentagens	
		Antes	Depois
American Public Health Association	≤ 2 UFC.cm^{-2}	0	50
World Health Organization	≤ 50 UFC.cm^{-2}	0	72
Biotrace	≤150 URL	0	0

5. Adesão de Esporos de *Bacillus sporothermodurans* em Aço Inoxidável avaliada pela Técnica do ATP-bioluminescência

A higienização de cupons de prova de aço inoxidável do simulador de uma linha de circulação de leite foi avaliada pela técnica da ATP-bioluminescência, conforme síntese do Quadro 13.

Quadro 13 - Síntese da pesquisa que avaliou a higienização de cupons de prova de aço inoxidável do simulador de uma linha de circulação de leite, pela técnica da ATP-bioluminescência

Microrganismo	Esporos de *Bacillus sporothermodurans*
Superfície	Aço inoxidável
Situações	I) Após a etapa de pré-lavagem, lavagem alcalina, sanitização e, ainda, esterilização a 121 °C, durante 15 min, dos cupons de prova II) Após a adesão dos esporos de *B. sporothermodurans* ao final de 12 h de incubação a 30 °C, com uma suspensão em tampão-fosfato contendo cerca de 10^{5} UFC.mL^{-1} III) Após o procedimento de sanitização CIP do sistema-modelo, utilizando-se 60 mg.L^{-1} de ácido peracético durante 15 min, entre 20 e 25°C
Técnica	ATP-bioluminescência

Fonte: Akutsu, 2001.

De acordo com o Quadro 14, os cupons avaliados após a sanitização e esterilização apresentaram resultados inferiores a 150 URL, ou seja, estavam limpos, livres de contaminação microbiana ou de resíduos orgânicos, com base na interpretação proposta pelo fabricante.

Quadro 14 - Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP-bioluminescência em diferentes situações. Valores expressos em Unidade Relativa de Luz (URL)

Condições de adesão	Cupons do modelo de linha de circulação de leite avaliados		
	Cotovelo 90°	Cilíndrico	T
Após a etapa de pré-lavagem, lavagem alcalina, sanitização e, ainda, esterilização a 121 °C, durante 15 min, dos cupons de prova	32	33	31
Após a adesão dos esporos de *B. sporothermodurans* ao final de 12 h de incubação a 30 °C, com uma suspensão em tampão-fosfato contendo cerca de 10^5 UFC.mL^{-1}	61	106	118
Após o procedimento de sanitização CIP do sistema-modelo, utilizando-se 60 mg.L^{-1} de ácido peracético, durante 15 min entre 20 e 25 °C	100	50	110

Após a adesão dos esporos, verificaram-se, em média, valores abaixo de 150 URL nos diferentes tipos de cupons de prova (Quadro 14); no entanto, os resultados da enumeração dos esporos pela técnica da contagem-padrão em placas mostraram valores em torno de 1,0 x 10^4 UFC.cm^{-2}. Assim, pelo método tradicional de contagem microbiana, as superfícies dos cupons encontravam-se em condições higiênicas insatisfatórias, quando comparadas com a recomendação da APHA, que sugere o máximo de 2 UFC.cm^{-2} para superfícies adequadamente higienizadas.

As informações obtidas pelos métodos ora apresentados foram inconsistentes. Conforme mencionado anteriormente, os esporos bacterianos não mostram metabolismo, níveis de ATP ou transporte de elétrons detectáveis, não tendo, portanto, energia suficiente para realizarem a reação de formação de luz (BAKER et al., 1992). Ao serem expostos ao complexo enzimático luciferina/luciferase, produziram menos luz, expressa em URL, do que as células vegetativas. Outra possível explicação, menos provável, mas que poderia contribuir para os resultados obtidos, seria o fato de a superfície não ser lisa, possuindo fissuras e ranhuras que podem dificultar a remoção do esporo aderido pelo *Swab*.

Os resultados das análises de ATP, ao se avaliarem os cupons depois da circulação da solução a 60 mg.L^{-1} de ácido peracético e pré-enxágüe com água à temperatura entre 20 e 25 °C por 3 min, evidenciaram que todos os tipos de cupons encontravam-se bem higienizados.

De acordo com os resultados, a técnica de ATP-bioluminescência não se mostra adequada para detectar a presença de esporos bacterianos aderidos em razão provavelmente do baixo nível de ATP detectável destes.

6. Interferência de Substâncias Orgânicas e de Microrganismos na Medida de ATP-Bioluminescência

6.1. Interferência de Substâncias Orgânicas Não-Aderidas a Superfícies

No Brasil, esta técnica tem sido aplicada e com tendência de ampliação de seu uso; no entanto, a interpretação do que se avalia nem sempre é realizada de forma adequada. Conforme mencionado, alguns fatores podem influenciar os resultados obtidos com a técnica ATP-bioluminescência, de forma a contribuir negativamente para o seu potencial de utilização como ferramenta no monitoramento de procedimentos de higienização. Dentre esses fatores, um que é pouco estudado e, conseqüentemente, pouco relatado em literatura é o efeito que resíduos orgânicos como proteína, lipídeos e carboidratos, oriundos do processamento de alimentos de origem animal e vegetal, pode causar na medida de ATP pela técnica de bioluminescência. Em razão dessa consideração, Simm (2004) avaliou o efeito de substâncias orgânicas em suspensão ou aderidas ao aço inoxidável na medida de ATP-bioluminescência, conforme síntese do Quadro 15.

Quadro 15 - Síntese de pesquisa que avaliou a interferência de resíduos orgânicos e microrganismos na medida do ATP-bioluminescência

Suspensão/Solução	
Substâncias orgânicas	i) caseína ii) banha de porco iii) sacarose iv) caseína + sacarose v) caseína + banha de porco vi) banha de porco + sacarose vii) caseína + banha de porco + sacarose
Microrganismos	i) *Staphylococcus carnosus* ii) esporos de *Bacillus subtilis*
Substâncias orgânicas + microrganismos	i) caseína + *S. carnosus* ii) banha de porco + *S. carnosus* iii) sacarose + *S. carnosus* iv) caseína + sacarose + *S. carnosus* v) caseína + banha de porco + *S. carnosus* vi) banha de porco + sacarose + *S. carnosus* vii) caseína + sacarose + banha de porco + *S. carnosus* viii) caseína + sacarose + banha de porco + esporos de *B. subtilis*

Fonte: SIMM, 2004

As suspensões de substâncias orgânicas foram preparadas de forma que a alíquota de 0,1 mL coletada pelo kit possuísse concentração de caseína, ou de gordura e ou de sacarose igual à daquelas mencionadas no Quadro 17.

Quanto aos microrganismos, foram avaliadas suspensões contendo $5,4x10^4$ $CDM.mL^{-1}$ para *S. carnosus* e de $2,9x10^3$ $CDM.mL^{-1}$ a $2,9x10^7$ $CDM.mL^{-1}$ para esporos de *B. subtilis*. A alíquota coletada com o kit correspondeu a uma diluição de 1:10 em relação às suspensões-teste. Essas foram preparadas de forma asséptica em tubos plásticos com tampa, com capacidade para 50 mL, utilizando-se as suspensões e soluções à temperatura de 30 °C.

As amostras foram coletadas, e procedeu-se ao contato com complexo enzimático luciferina/luciferase, para promover a reação de emissão de luz. O kit foi introduzido no luminômetro, onde foi realizada a leitura do número de URL após, aproximadamente, 10 seg.

Para o delineamento experimental e análise dos resultados, foram empregados diferentes procedimentos do programa *Statistical Analysis System* (SAS/2004):

a) Os ensaios para avaliação: i) dos três tipos e três concentrações de substâncias orgânicas em suspensão/solução; e ii) dos três tipos e três concentrações de substâncias orgânicas em suspensão/solução adicionada de *S. carnosus* seguiram um modelo de delineamento aninhado com concentração por substância. O experimento foi realizado em três repetições, e as determinações do número de URL foram feitas em duplicatas.

b) As médias de todos os tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan, a de 5 % de probabilidade.

c) A avaliação das combinações de substâncias orgânicas em suspensão/solução seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos, em três repetições. As determinações do número de URL foram feitas em duplicatas. As comparações de interesse, testadas pelo teste F, estão representadas a seguir (Quadro 16):

d) A avaliação da combinação de duas e três substâncias orgânicas em suspensão/solução adicionada de *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis* seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos, em três repetições. As determinações do número de URL foram feitas em duplicatas. As comparações de interesse, testadas pelo teste F, estão representadas no Quadro 16.

6.1.1. Interferência de Substâncias Orgânicas não Aderidas à Superfície

Constatou-se diferença significativa ($p<0,05$) no número de URL entre caseína e banha de porco e a sacarose (Quadro 17). A sacarose apresentou o menor número de URL quando comparada com a caseína e a banha de porco, e as duas últimas não apresentaram diferença significativa entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan. As concentrações diferentes em cada uma das substâncias não apresentaram diferença significativa ($p\geq0,05$) na medida de URL. Quando as

substâncias orgânicas estão combinadas, observa-se que a associação banha de porco e sacarose apresenta uma média de log de URL menor ($p<0,05$) do que a das demais combinações (Quadro 17).

Quadro 16 - Comparações de interesse avaliadas pelo Teste F

Contraste	Comparações
1	Caseína *vs.* caseína+sacarose
2	Caseína *vs.* caseína+banha de porco
3	Banha de porco *vs.* caseína+banha de porco
4	Banha de porco *vs.* banha de porco+sacarose
5	Sacarose *vs.* caseína+sacarose
6	Sacarose *vs.* banha de porco+sacarose
7	Caseína+sacarose *vs.* caseína+sacarose+banha de porco
8	Caseína+banha de porco *vs.* caseína+sacarose+banha de porco
9	Banha de porco+sacarose *vs.* caseína+sacarose+banha de porco
10	Caseína+banha de porco+sacarose *vs.* caseína+banha de porco+ sacarose+ *S. carnosus*
11	*S. carnosus vs.* caseína+ banha de porco+sacarose+*S. carnosus*
12	Caseína+banha de porco+sacarose *vs.* caseína+banha de porco+sacarose+ esporos de *B. subtilis*
13	Esporos de *B. subtilis vs*. caseína+banha de porco+sacarose +esporos de *B. subtilis*

Quadro 17 - Média e desvio-padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz (log de URL) das suspensões e soluções de substâncias orgânicas . Média de três repetições

	mg.mL^{-1}	LURL	Média (± σ)
	3,5	1,74	
Caseína	7,0	1,87	1,81 (0,02) a
	11	1,84	
	7,0	1,83	
Banha de porco	14	1,81	1,88 (0,09)a
	21	2,01	
	0,6	1,69	
Sacarose	1,2	1,65	1,67 (0,12)b
	1,8	1,68	
Caseína+banha de porco	7,0+14,0		2,07 (0,03) a
Caseína+sacarose	7,0 +1,2		2,02 (0,02) a
Banha de porco+sacarose	14,0+ 1,2		1,57 (0,08) b
Caseína+banha de porco+sacarose	7,0+14,0+1,2		2,03 (0,05) a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

6.1.2. Interferência de Microrganismos em Substâncias Orgânicas não Aderidas à Superfície

Em relação às suspensões contendo concentrações semelhantes de microrganismos e avaliadas isoladamente, o número médio de URL para de *S. carnosus* foi maior

(p<0,05) do que aquele obtido nas suspensões com esporos de *B. subtilis,* conforme o teste *'t', de Student*. O logaritmo do número de URL foi 3,79 nas células vegetativas e 1,95 nos esporos bacterianos (Quadro 18), o que corresponde a 69 vezes a mais na medida da bioluminescência. Em relação aos esporos, não houve diferença (p≥0,05) no número de URL nas contagens de 2,9X10^3 UFC.mL^{-1}, 2,9x10^4 UFC.mL^{-1}, 2,9x10^5 UFC.mL^{-1}, com média de 1,93 log de URL. Porém, nas contagens de 2,9x10^7 UFC. mL^{-1}, o log de URL atingiu 2,6.

Quadro 18 - Média e desvio-padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz das suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas de microrganismos

Suspensão e Solução	Concentrações	Média (±σ)
Suspensão de *Staphylococcus carnosus**	5,4x10^4	3,79 a(0,12)
Suspensão de esporos de *B. Subtilis*	2,9X10^3	1,90 b(0,02)
	2,9x10^4	1,95 b(0,05)
	2,9X10^5	1,96 b(0,02)
	2,9x10^7	2,60 a(0,03)
Caseína+*S. carnosus*	11,0	3,12 b(0,21)
	7,0	3,13 b(0,12)
	3,5	3,76 a(0,23)
Banha de porco+*S. carnosus*	21,0	3,96 a (0,02)
	14,0	3,88 b(0,09)
	7,0	4,04 a(0,03)
Sacarose+*S. Carnosus*	1,8	3,83 a(0,10)
	1,2	3,93 a(0,10)
	0,6	3,94 a(0,06)
Caseína + banha de porco + sacarose**	7,0+14,0+1,2	2,03 b(0,05)
Caseína+ banha de porco + sacarose +*S.carnosus*	3,5+14,0+1,2+5,4x104	3,12 a(0,21)
Caseína + banha de porco+sacarose + *S. carnosus*	7,0+14,0+1,2+5,4x104	3,13 a(0,12)
Caseína+ banha de porco+sacarose + *S. carnosus*	11,0+14+1,2+5,4x104	3,76 a(0,23)
Caseína+banha de porco+sacarose + *S. carnosus*	7,0+7,0+1,2+5,4x104	3,96 a(0,02)
Caseína+banha de porco+sacarose + *S.carnosus*	7,0+14+1,2+5,4x104	3,88 a(0,09)
Caseína+ banha de porco+sacarose + *S. Carnosus*	7,0+21+1,2+5,4x104	4,04 a(0,06)
Caseína+banha de porco+sacarose + *S. carnosus*	7,0+14+0,6+5,4x104	3,83 a(0,10)
Caseína+banha de porco+sacarose + *S.carnosus*	7,0+14+1,2+5,4x104	3,93 a(0,10)
Caseína+banha de porco+sacarose + *S.carnosus*	7,0+1,8+5,4x104	3,04 a(0,06)
Caseína+sacarose+banha de porco + *esporos de B.subilis*	7,0+1,2+14,0+2,9x104	2,09 b(0,05)

6.1.3. Interferência de Combinações entre Substâncias Orgânicas e Microrganismos

O número de URL foi menor (p<0,05) nas combinações de substâncias orgânicas contendo 11,0 e 7,0 mg.mL^{-1} de caseína e 14 mg.mL^{-1} de banha de porco adicionadas de 5,4x10^4 CDM.mL^{-1} de *S. carnosus* (Quadro 18). O número médio de URL obtido na combinação contendo 7,0 mg.L^{-1} de caseína, 14 mg.L^{-1} de banha de porco e 1,2 mg.L^{-1} de sacarose (log de URL = 2,03) foi menor (p<0,5) do que o encontrado na mesma combinação adicionada de *S. carnosus* (log de URL= 3,13), portanto um aumento de

aproximadamente 12 vezes na medida de bioluminescência. Comparada à suspensão contendo de $5,4x10^4$ CDM.mL^{-1} de *S. carnosus* (log de URL = 3,79), a combinação contendo 7,0 mg.L^{-1} de caseína, 14 mg.L^{-1} de banha de porco e 1,2 mg.L^{-1} de sacarose apresentou um log URL cerca de 57 vezes menor (2,03).

Nas suspensões de esporos de *B. subtilis* adicionadas de substâncias orgânicas, não se observou diferença significativa ($p<0,05$) na medida de URL (log = 2,09), em comparação com a combinação contendo 7,0 mg.L^{-1} de caseína, 14 mg.L^{-1} de banha de porco e 1,2 mg.L^{-1} de sacarose (log = 2,03) (Tabela 5).

6.1.4. Substâncias Orgânicas *versus* Técnica do ATP-bioluminescência

Pode-se afirmar que, em termos objetivos e práticos, a interferência das substâncias orgânicas na medida de ATP-bioluminescência para determinar as condições higiênicas de superfícies de processamento é pouco relevante. Essa afirmativa é verdadeira desde que, de acordo com as proposições do fabricante do equipamento de bioluminescência, caso as amostras analisadas fossem oriundas de coletas realizadas em superfícies de processamento de alimentos, os resultados indicariam que as superfícies estariam em condições higiênicas satisfatórias, com valores de log de URL abaixo de 2,18.

6.1.5. Microrganismos *versus* Técnica do ATP-bioluminescência

Apesar de as suspensões de microrganismos estarem em concentrações microbianas próximas ($5,4x10^4$ UFC.mL^{-1} de *S. carnosus* e $2,9x10^4$ UFC.mL^{-1} de esporos de *B. subtilis*), a diferença na medida de URL pode ser explicada, levando-se em consideração o conteúdo intracelular de ATP das células vegetativas e dos esporos bacterianos. Os esporos, por estarem em um estado criptobiótico, não apresentam metabolismo e, por isso, têm baixos níveis de ATP e ausência de transporte de elétrons. Esses fatores levam a uma reduzida leitura na medida de URL. Kodaka et al. (1996) determinaram uma concentração 10^{-17}mol de ATP por célula vegetativa e de 10^{-21} mol de ATP por esporo. Isso significa que a concentração de ATP do esporo bacteriano é 10.000 vezes menor. Dessa forma, os valores do LURL acima de 2,48 (300 URL) na suspensão de *S. carnosus* indicariam condições higiênicas insatisfatórias, se as amostras analisadas fossem oriundas de coletas realizadas nas superfícies de processamento. Já os log dos valores de URL nas suspensões de esporos de *B. subtilis* foram abaixo de 2,18 (<150 URL), significando, seguindo o mesmo raciocínio, que se as amostras fossem de uma superfície para processamento, elas estariam em condições higiênicas satisfatórias. Assim, uma superfície com contagem elevada de esporos seria aprovada para o processamento de alimentos pela técnica do ATP-bioluminescência.

6.1.6. Substâncias Orgânicas Adicionadas de Microrganismos *versus* a Técnica do ATP bioluminescência

Observando os valores do LURL dos testes com uma substância orgânica combinada ou não com os microrganismos, constatam-se possíveis interações entre a bactéria e as substâncias afetando a leitura da bioluminescência. Richardson et al. (1980), estudando a distribuição desses nucleotídeos no leite bovino, constataram a possibilidade de associação de moléculas de ATP com a caseína, impedindo-o de reagir com o complexo luciferina/luciferase. Nesse experimento, observou-se que a menor concentração de caseína apresentou maior número de URL. Na banha de porco, o resultado foi inconsistente, pois o número de URL foi menor na concentração intermediária (14 $mg.L^{-1}$ de banha de porco). Não se observou interferência nas suspensões de sacarose e no microrganismo, que não apresentaram alterações no número de URL nas diferentes concentrações da substância.

A interferência da amostra na medida de bioluminescência foi relatada por Webster et al. (1988), quando determinaram a concentração de ATP microbiano em amostras de leite cru. Segundo esses autores, a medida de URL foi afetada devido à absorção e dispersão da luz formada na reação do ATP com o sistema enzimático luciferase/luciferina pelo material coloidal da amostra. Isso poderia acontecer em um sistema semelhante, como o usado neste estudo, que consistiu em combinações de gordura, proteína, carboidrato e microrganismos. Também, Baker et al. (1992) citaram que a leitura da luz emitida após a reação de bioluminescência pode ser afetada pela turbidez e cor da amostra.

O número de URL na suspensão contendo apenas célula vegetativa foi sempre maior do que qualquer suspensão/solução contendo apenas substâncias orgânicas, isoladas ou em combinações, sendo os valores do log de URL, em alguns casos, duas vezes maiores. A presença do microrganismo na combinação com as substâncias orgânicas acrescentou uma quantidade grande de ATP à suspensão/solução, nivelando a concentração do nucleotídeo em uma faixa de valores elevados, proporcionando a detecção do número de URL similar. Isso mostra, mais uma vez, a pouca interferência das substâncias orgânicas na bioluminescência das suspensões avaliadas. A presença destas em suspensões contendo uma fonte grande de ATP não foi suficiente para que fosse detectada qualquer diferença no número de URL.

Considerando o valor de log de URL de 2,18, proposto pelo fabricante do equipamento usado no experimento, têm-se as seguintes conclusões:

As suspensões contendo as substâncias orgânicas isoladas ou em associação ou, ainda, adicionadas de esporos de *Bacillus subtilis*, caso fossem oriundas de superfícies de processamento de alimentos, indicariam que elas estariam em condições higiênicas satisfatórias, podendo, assim, originar resultados falsos negativos.

As suspensões de *S. carnosus* adicionadas de caseína, banha de porco ou sacarose, isoladamente ou em combinações, caso fossem oriundas de superfícies de processamento de alimentos indicariam que elas estariam em condições higiênicas insatisfatórias.

A técnica pode ser usada como ferramenta auxiliar no monitoramento de procedimentos de higienização desde que seja associada a outros métodos, como contagem microbiana. Essa técnica deve ser usada com cuidado, e o significado dos resultados das análises deve ser corretamente entendido pelos profissionais que utilizam essa metodologia na avaliação das superfícies que entram em contato com alimentos.

6.2. Interferência de Substâncias e Microrganismos Aderidos ao Aço Inoxidável AISI 304, nº4

6.2.1. Substâncias Orgânicas Aderidas à Superfície

No Quadro 19 são apresentados a média e o desvio-padrão dos logaritmos decimais do número de URL das combinações avaliadas.

Quadro 19 - Média e desvio-padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz de substâncias orgânicas aderidas ao aço inoxidável. Média de três repetições

Combinações*	Média (± σ)
Caseína+lipídeo	1,90 (0,17)
Caseína+sacarose	2,08 (0,05)
Lipídeo+sacarose	1,95 (0,11)
Caseína+lipídeo+sacarose	2,07 (0,09)

* Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 0,7; 1,4; e 0,12 mg.100 cm^{-2}, respectivamente.

Segundo as recomendações do fabricante do luminômetro, superfícies de processamento de alimentos são consideradas em condições higiênicas insatisfatórias quando o $\log_{10}$URL for maior que 2,48. Quando esse valor estiver abaixo de 2,18 significa que as condições são satisfatórias. Porém, quando o logaritmo do número de URL estiver entre esses dois valores significa condição de alerta.

Nas condições deste experimento, todas as superfícies seriam consideradas em condições higiênicas satisfatórias, estando aptas ao processamento de alimentos, uma vez que os resultados com a técnica de ATP-bioluminescência ficaram abaixo do limite de URL de 2,18.

6.2.2. Microrganismos e a Medida de ATP-bioluminescência

No Quadro 20, tem-se uma síntese da pesquisa que avaliou a interferência de microrganismos aderidos ao aço inoxidável na medida do ATP-bioluminescência.

Quadro 20 - Síntese da pesquisa que avaliou a interferência de microrganismos sésseis na medida do ATP-bioluminescência

Microrganismos	*Staphylococcus carnosus* e esporos de *Bacillus subtilis*
Concentrações dos microrganismos	$5,4x10^3$, $5,4x10^4$ e $5,4x10^5$ CDM.mL^{-1} de *S.aureus* $2,9x10^3$, $2,9X10^4$ e $2,9x10^5$ CDM.mL^{-1} de esporos de *B.subtilis*
Formas de avaliação	Séssil: aderidos ao aço inoxidável, AISI 304, n° 4
Análise de resultados	As medidas de URL foram analisadas empregando-se o procedimento do test "t", de Student, do Programa Statistical Analysis System (SAS/2004)
Técnica	ATP-bioluminescência. Resultados expressos e URL

Fonte: SIMM, 2004.

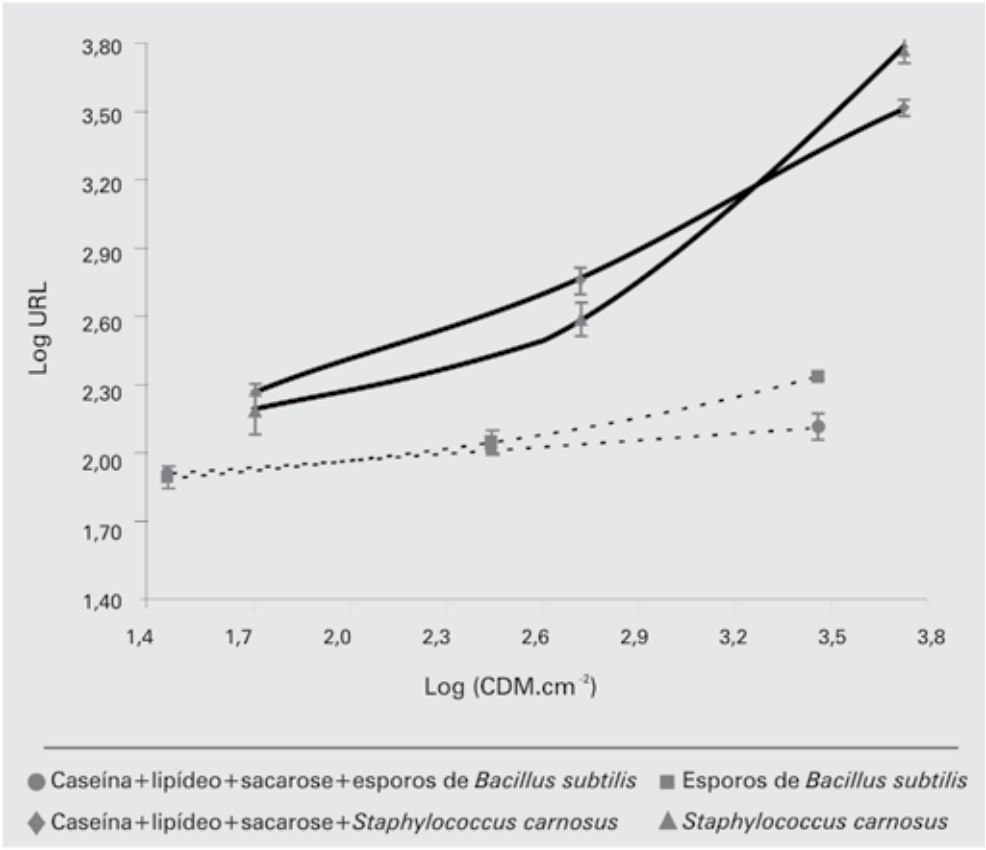
As medidas de URL para suspensões de *S. carnosus* foram maiores ($p<0,01$) que aquelas obtidas nas suspensões com esporos de *B. subtilis*, conforme o teste *t de Student*. Os valores do logaritmo de URL atingiram 3,79 nas células vegetativas e 1,95 nos esporos bacterianos. Apesar de as suspensões estarem em concentrações próximas, essa diferença pode ser explicada, levando-se em consideração a diferença no conteúdo intracelular de ATP entre células vegetativas e esporos bacterianos. Os esporos bacterianos, por estarem em um estado criptobiótico, não apresentam metabolismo, o que acarreta baixos níveis de ATP e ausência de transporte de elétrons (BAKER et al., 1992; AKUTSU, 2001), fatores que levam a uma reduzida leitura na medida de URL.

Kodaka et al. (1996) determinaram uma concentração 10^{-17}mol de ATP por célula vegetativa e de 10^{-21} mol de ATP por esporo, significando que a concentração de ATP do esporo bacteriano é 10.000 vezes menor. Essa explicação também pode ser aplicada à diferença ($p<0,01$) da medida de URL entre suspensões contendo caseína, lipídeo e sacarose adicionadas de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL^{-1} de *S. carnosus*, cujo logaritmo de URL atingiu o valor de 3,23 $\log_{10}$URL e adicionada de $2,9 \times 10^4$ CDM. mL^{-1} de esporos de *B. subtilis*, com logaritmo de URL de 2,09 .

Observa-se, na Figura 4, que há aumento na medida de URL quando se eleva a concentração de microrganismos para as suspensões de *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis*, aderidas ao aço inoxidável, resultado que foi confirmado com o teste de Duncan, realizado com as médias de cada um dos tratamentos, a 5% de probabilidade. Observa-se ainda, nessa figura, que as medidas de URL foram maiores nas suspensões contendo células vegetativas do que nas que possuíam esporos bacterianos, assim como já havia sido verificado para as suspensões não aderidas. A diferença no conteúdo intracelular de ATP entre células vegetativas e esporos bacterianos pode ser a explicação para as menores medidas de URL determinadas nos esporos.

Em conclusão, constatou-se maior medida de URL na suspensão contendo $5,4x10^4$ CDM.mL^{-1} de *Staphylococcus carnosus*, com logaritmo de URL de 3,79, em relação àquela que continha $2,9x10^4$ CDM.mL^{-1} de esporos de *Bacillus subtilis,* cujo

logaritmo de URL foi de 1,95. No que se refere às suspensões de células vegetativas ou esporo bacteriano aderidas ao aço inoxidável, adicionadas ou não das três substâncias orgânicas, pode-se fazer a mesma constatação para qualquer uma das concentrações microbianas analisadas, ou seja, as medidas de URL nas células vegetativas foram sempre maiores que nos esporos bacterianos.



[a]caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0, 14,0 e 1,2 mg.mL^{-1}, respectivamente
[b]esporos de *Bacillus subtilis* nas concentrações 2,9x10^{3} CDM.cm^{-2}; 2,9x10^{2} CDM.cm^{-2}; 2,9x10^{1} CDM.cm^{-2}
[c]*Staphylococcus carnosus* nas concentrações 5,4x10^{3} CDM.cm^{-2}, 5,4x10^{2} CDM.cm^{-2}, 5,4x10^{1} CDM.cm^{-2}

Figura 4 - Logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de microrganismos, adicionadas ou não de três substâncias orgânicas, aderidas ao aço.

Conclusão

A técnica do ATP-bioluminescência no estágio atual pode ser usada como ferramenta auxiliar no monitoramento de procedimentos de higienização desde que seja associada a outros métodos, como contagem microbiana. Esta técnica deve ser usada com cuidado, e o significado dos resultados das análises deve ser corretamente entendido pelos profissionais que utilizam essa metodologia na avaliação das superfícies que entram contato com alimentos.

Referências

ADAMS, M. R.; HOPE, C. F. A. **Rapid methods in food microbiology**. Holanda: Elservier, 1989. 330 p., 26 v.

AKUTSU, C.K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

BAKER, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p. 62-70, 1992.

BARRICHELLO, A.; ALLIL, M. C. A. Bioluminescência: uma nova ferramenta para tornar o controle microbiológico mais rápido, fácil e preciso. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 52, n. 300, p. 71-79, 1997.

BIOTRACE. BIOTRACE Xcel. [S.l]. 2000. 140p (Manual técnico).

BRASIL. Leis, Decretos etc. Portaria n°36, de 19 de janeiro de 1990, Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, v. 18, n.16, p.1651-1654, 23 jan. 1990. Seção 1.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, v. 59, p. 266 - 270, 26 mar. 2004.Seção 1.

BRASIL. Leis, Decretos, etc... Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005, Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, n. 53, p. 58- 63, 18 mar. 2005. Seção 1.

COLQUHOUN, K. O.; TIMMS, S.; FRICKER, C. R. A Simple method for the comparison of commercially available ATP hygiene-monitoring systems. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v. 61, n. 4, 1998.p.499-501.

CORBITT, A. J.; BENNION, N.; FORSYTHE, S. J. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for higiene monitoring in the food and beverage industry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 443-447, 2000.

COSTA, P. D. **Avaliação da técnica de ATP-bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COSTA P. D.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F.; BRANDÃO, S. C. C. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37 p. 345-349, 2006.

CROMBRUGGE, V.; WAES, G. Methods for assessing the bacteriological quality raw milk from the farm. ATP method. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 256, p. 53-60, 1991a.

CROMBRUGGE, V.; WAES, G. Methods for assessing the bacteriological quality raw milk from the farm. Impedance method. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 256, p. 41-44, 1991b.

DOUGLAS, C. W. I.; ROTHWELL, P. S. Evaluation of a hygiene monitor for detection of contamination in dental surgeries. **British Dental Journal**, v. 170, p. 331-335, 1991.

DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. APHA, 2001. 676 p.

GIESE, J. H. Sanitation: the Key to food safety and public health. **Food Technology**, v. 45, n. 12, p. 74-80, 1991.

GÓMEZ, J. M. R. Applications of bioluminescence in the food industry. **Alimentación Equipos y Tecnología**, v. 62, p. 86-90, 1999.

GREEN, T. A.; RUSSEL, S. M.; FLETCHER, D. L. Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP-bioluminescence measurements. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 86-90, 1999.

GRIFFITHS, C. J.; COOPER, R. A.; GILMORE, J.; DAVIES, C.; LEWIS, M. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. **Journal of Hospital Infection**, v. 45, p. 19-28, 2000.

GRIFFITHS, M. W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. **Journal Dairy Science,** v. 76, p. 3118-3125, 1993.

HAWRONSKYJ, J. M.; HOLAH, J. ATP universal hygiene monitor. **Trends in Food Science and Technology,** v. 8, p. 79-84, 1997.

KENNEDY Jr., J. E.; OBLINGER, J. L. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 4, p. 334-340, 1985.

KODAKA, H.; FUKUDA, K.; MIZUOCHI, S.; HORIGOME, K. Adenosine triphosphate content of microrganisms related with food spoilage. **Japanese Journal of Food Microbiology**, v. 13, p. 29-34, 1996.

LILIEVELD, H. L.M..; MOSTERT, M. A.; HOLAH, J. Handbook of hygiene control in the food industry. CRC Press, Cambrige, England, 720p, 2005

MURPHY, S. C.; KOZLOWSKI, S. M.; BLANDER, D. K.; BANDLER, D. K.; BOOR, K. J. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 3, p. 817-820, 1998.

RICHARDSON, T.; McGANN, T. C. A. ; KEARNEY, R. D. Levels and locations of adenosine 5□-triphosphate in bovine milk. Journal of Dairy Research, 47:91-96, 1980

SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C. N. Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 764-769, 1995.

SIMM, E. M. **Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos na técnica de ATP-Bioluminescência**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

STANNARD, C. J.; WOOD, J. M. The rapid estimation of microbiology contamination of raw meat by measurement of adenosine triphosphate. **Jounal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 429-438, 1983.

TYDRICH, L. New applications for ATP bioluminescence methods. **Cereal Foods World**. v. 41, n. 6, p. 463-465, 1996.

VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J. M. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 7, p. 799-803, 1997.

ZOTTOLA, E. A. Special techiniques for studying microbial biofilms in food systems.In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. **Food microbiological anaysis**- New technologies - Dekker, IFT Basic Symposia, Marcell , 1997. p. 315-346.

Capítulo 10

Avaliação Laboratorial de Sanitizantes Químicos

1. Introdução
   - 1.1. Teste da Diluição de Uso
   - 1.2. Teste de Suspensão
   - 1.3. Teste do Coeficiente Fenólico
   - 1.4. Teste de Capacidade
   - 1.5 Teste de Ação Esporicida
2. Avaliação da Resistência de *Enterococcus faecium* Isolado de Leite Cru aos Agentes Químicos Sanitizantes
   - 2.1. Avaliação pelo teste da diluição de uso
   - 2.2. Avaliação pelo Teste de Suspensão
3. Eficiência do Ácido peracético Sobre Esporos de *Bacillus sporothermodurans* Avaliada pelos Testes de Diluição de Uso e de Suspensão
   - 3.1. Avaliação pelo Teste da Diluição de Uso
   - 3.2. Avaliação pelo Teste de Suspensão
   - 3.3. O teste de Suspensão *versus* o Teste da Diluição de Uso
4. Modelagem Matemática na Relação Tempo e Concentração de Ácido Peracético na Ação Esporicida Sobre *Bacillus sporothermodurans*
5. Registro de Sanitizantes em Órgãos Governamentais
   - 5.1. Informações para Registro
   - 5.2. Informações para Avaliação dos Princípios Ativos
   - 5.3. Rotulagem
   - 5.4. Classificação de Riscos dos Sanitizantes
6. Sanitizantes Aprovados no Brasil
7. Conclusão
8. Referências

Nélio José de Andrade
Roberta Torres Careli
Aurélia D. Oliveira Martins

Os testes laboratoriais padronizados são úteis para a comparação da atividade sanitizante de produtos, concentrações, tempos e temperaturas de contato, entre outras variações e condições.

1. Introdução

A avaliação da eficiência dos sanitizantes é bastante complexa, principalmente em razão dos inúmeros fatores que poderão afetá-la. Assim, a natureza e tipo de superfícies tratadas, a concentração e natureza dos resíduos a elas aderidos, o tipo de microbiota contaminante na superfície, a concentração e o período de contato do sanitizante com a superfície são apenas algumas das variáveis que poderão afetar, em menor ou maior grau, a eficiência dos sanitizantes. Dessa forma, é evidente a importância da realização de alguns testes que permitam a seleção de um produto ideal para as condições específicas de uso na indústria de alimentos.

As comprovações da eficiência microbiológica dos sanitizantes químicos são necessárias, e uma das formas de se confirmar isso é por meio de testes laboratoriais, como os de diluição de uso, de capacidade, de coeficiente fenólico, teste esporicida e de suspensão. Deve-se frisar que, na maioria das vezes, apenas a determinação do princípio ativo dos produtos sanitizantes comerciais ou de suas soluções diluídas para uso rotineiro no procedimento de higienização não é suficiente para definir a atividade antimicrobiana. Produtos comerciais que originam soluções sanitizantes com mesma concentração do princípio ativo poderão apresentar eficiências diferentes sobre os microrganismos, mostrando necessidade de se avaliar a ação desses agentes diretamente sobre os microrganismos, usando-se metodologias adequadas.

No Quadro 1 são apresentadas as propriedades e aplicações de substâncias químicas antimicrobianas na indústria de alimentos que causam injúrias aos microrganismos.

Quadro 1. Propriedades e usos de substâncias químicas antimicrobianas de uso na indústria de alimentos que causam injúria em membranas celulares

Grupos	Exemplos	Propriedades relevantes	Mecanismos de ação	Usos
Sabões	Sais de Na ou K de ácidos graxos de cadeia longa	Diminuição da tensão superficial; ação bactericida melhorada pela alta temperatura	Rompem membranas celulares e aumentam a permeabilidade	Limpeza, remoção mecânica de microrganismos
Detergentes	Geralmente derivados de origem petroquímica. Dodecibenzeno sulfonato de sódio é o mais usado	Cadeias de hidrocarboneto hidrofóbica ligada a um cátion ou ânion hidrofílico; melhor atividade à alta temperatura; inativado por sabões	Rompem membranas celulares, provavelmente por combinarem com lipídeos e proteínas; compostos de Na e K extravasam das células	Limpeza e ação bactericida
	Lauril sulfato de sódio	Ânion: carboxílico, sulfato, sulfonato, ativo em soluções ácidas		Em meio de cultura seletivo, matam bactérias Gram-positivas
	Quaternário de amônio	Cátion: amônio substituído; mais ativo em solução alcalina		Desinfecção da pele, sanitização industrial; matam bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Grupos	Exemplos	Propriedades relevantes	Mecanismos de ação	Usos
Ácidos	Ácido mineral: H_2SO_4, HCl, HNO_3, H_3PO_4	Alta concentração de íons H	Corrosivos	Limitado por corrosividade, principalmente para uso em laboratório
	Ácidos orgânicos: acético, benzóico e bórico	Fracamente ionizados	Ânions ou moléculas não dissociadas combinam com constituintes protoplasmáticos	Preservação, antissepsia suave
Bases	Na(OH), Na_2CO_3, $Ca(OH)_2$, Na_3PO_4	Íons OH-	Corrosivo	Desinfecção de estábulos, granjas; lava louças e sanitização industrial
Álcoois	Em ordem de aumento de atividade: metil, etil, propil, butil, amil	Álcool etílico usado em limpeza a seco	Bacteriostáticos e bactericidas; desnaturam e coagulam proteínas	Desinfecção da pele (70% C_2H_5OH), usados em tinturas para aumentar o poder de molhagem de outras substâncias químicas; matam células vegetativas, pouco efetivo contra esporos
Fenóis	Fenol, cresol, lisol, hexilresorcinol	Diminuição da tensão superficial; atividade melhorada pela alta temperatura, ácido	Bactericidas; desnaturação e precipitação de proteínas	Desinfecção de equipamentos de laboratório, instrumentos, bancadas, lixeira, baldes, banheiros
	Bifenol (hexaclorofeno)		Bacteriostáticos	Desodorizante em sabões; inibe bactéria Gram-positiva
Agentes oxidantes	Hipoclorito de sódio ou de cálcio	Inibidos pela presença de matéria orgânica	Bactericida; oxida -SH, $-NH_2$, ou grupos indol de núcleos de enzimas ou coenzimas	Desinfecção de água, desinfecção industrial, desinfecção ambiental, sanitização de equipamentos e utensílios
	Iodo	Pouco afetado pela matéria orgânica	Bactericida: inativa enzimas pela dimerização da tirosina	Desinfecção da pele
	H_2O_2	Instável; decomposto em H_2O e O_2	Bacteriostático, levemente bactericida, em baixa concentrações	Antisséptico de cortes, ferimentos leves
Clorhexidina	Derivado da biguanida	Amplo espectro de ação antimicrobiana	Bactericida, desnaturação e coagulação do protoplasma	Desinfecção de ambientes, de manipuladores, de equipamentos e utensílios
Extrato de semente de *Grape Fruit*	Extrato vegetal	Antioxidantes e ácidos orgânicos	Bactericida	Desinfecção e sanitização de ambientes, manipuladores, equipamentos e utensílios
Formaldeído	HCHO	Reage com grupos NH_2 e OH; relativamente não afetado por presença de matéria orgânica orgânica; efetivo contra esporos	Bactericida em alta concentração; reage com enzimas, ácidos nucléicos; coagula proteínas	Desinfecção de laboratório e equipamentos e instrumentos cirúrgicos

Os testes laboratoriais padronizados são úteis para comparar a atividade de sanitizantes em vários produtos e diluições, tempo de contato e temperatura, entre outras variações e condições. São esses os fatores que afetam a eficiência de sanitizantes químicos usados na indústria de alimentos: concentração de uso; tipo e concentração de microrganismos; tipos e rugosidade das superfícies; concentração e natureza dos resíduos; tempo de contato e temperatura de aplicação; e método de higienização.

1.1. Teste da Diluição de Uso

A diluição de uso, um teste laboratorial amplamente aceito, reconhecido como rigoroso e bem padronizado, tem como principais objetivos determinar a maior diluição do sanitizante que ainda apresenta eficiência bactericida e avaliar as concentrações de sanitizantes recomendadas pelos fabricantes. Esse tipo de teste tem sido recomendado nos Estados Unidos pela *Environmental Protection Agency* (EPA), para registro e especificações comerciais de sanitizantes.

Esse teste consiste em submeter células de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, aderidas às superfícies de cilindros de aço inoxidável, à ação de soluções de sanitizantes, sendo aprovadas aquelas que destruírem o organismo-teste aderido em 59 cilindros de 60 avaliados, após 10 min de contato à temperatura de 20 °C. Como adaptação deste teste para a indústria de alimentos, sugere-se a aprovação de sanitizantes que conseguirem destruir os microrganismos aderidos a 10 cilindros, nas mesmas condições de temperatura e tempo de contato.

No Quadro 2 estão sintetizadas as aplicações, fundamentos e limitações do teste de diluição de uso.

Quadro 2 - Aplicações, fundamentos e limitações do teste de diluição de uso

Teste de diluição de uso	
Aplicações	Confirma os resultados do coeficiente fenólico Determina a maior diluição para uso do sanitizante Avalia recomendações do fabricante
Fundamentos	Destruição de microrganismos aderidos em cilindros de aço inoxidável em 10 min de contato
Limitação	Dificuldade em diferenciar sanitização e detergência Não simulação adequada das condições usuais da indústria de alimentos Incorporação ao meio de quantidades mínimas de sanitizante Eficiência afetada por filmes de matéria orgânica do meio ou metabólitos microbianos

Apesar de amplamente aceito, ainda são realizadas pesquisas com o objetivo de melhorar a eficiência desse teste, na tentativa de padronizar o número de bactérias na superfície do cilindro e usar outros cilindros além do aço inoxidável, como a porcelana, o vidro, o alumínio e o polipropileno.

1.2. Teste de Suspensão

O teste de suspensão avalia a eficiência de sanitizantes na redução de uma população microbiana em suspensão, sob condições práticas de uso, e é recomendado pela AOAC para avaliar sanitizantes empregados em superfícies não porosas, previamente limpas, que entram em contato com os alimentos.

Os resultados dos testes são apresentados na forma de número de reduções decimais (RD) na população microbiana de *Escherichia coli* ATCC 11229 e de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, levando-se em conta o tempo de exposição e a concentração do sanitizante. O número de reduções decimais é a diferença entre o logaritmo decimal do total de microrganismos na suspensão microbiana e o logaritmo decimal de sobreviventes após o contato com a solução sanitizante. Será aprovado o sanitizante que assegurar redução decimal superior ou igual a 5, que corresponde a uma redução de cinco ciclos logarítmicos ou 99,999 %, na população microbiana, após 30 seg de exposição, a 20 °C (Quadro 3). Os Quadros 4 e 5 indicam exemplos de resultados de testes de suspensão.

Quadro 3 - Fundamento, interpretação e limitação do teste de suspensão

Teste de suspensão	
Fundamento	- Redução do número de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em 30 segundos de contato a 20 °C
Interpretação	- Aprovação: 5 RD (99,999 %) da população microbiana
Limitação	- Neutralizante adequado para cada sanitizante

Quadro 4 - Exemplo de resultado do teste de suspensão

Produto clorado	100 $mg.L^{-1}$ CRT, pH 9,5
Microrganismo	*Escherichia coli*
Número inicial	$2x10^8$ $UFC.mL^{-1}$
Número de sobreviventes	$2x10^4$ $UFC.mL^{-1}$
% redução	99,999
Número de reduções decimais	5,0
Conclusão	Sanitizante aprovado

Quadro 5 - Número de reduções decimais na população de esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 16569

Soluções sanitizantes	Tempo de contato (min)		
	1	3	5
200 mg.L^{-1} CRL, pH 7,8 a 27 °C	1,30	4,00	5,00
25 mg.L^{-1} IRL, pH 6,8 a 27 °C	0,05	0,08	0,11
25 mg.L^{-1} IRL, pH 5,8 a 27 °C	0,01	nd	nd
300 mg.L^{-1} APA, pH 2,5 a 35 °C	0,43	1,20	2,80
5 % H_2O_2, pH 4,0 a 60 °C	0,06	2,90	3,60

nd = redução não-detectável;
CRL = cloro residual total; IRL= iodo residual livre; e
APA= ácido peracético.

O uso de neutralizantes nos meios de subcultivos, após o contato do microrganismo com o agente sanitizante, particularmente na metodologia do teste de suspensão, é fundamental. A diluição e a neutralização geralmente são as técnicas preferidas para inativar os sanitizantes, podendo ser usados individualmente ou de forma simultânea. Outra técnica, embora menos usada, para inativar agentes químicos é a lavagem das células microbianas, consistindo na inativação dos sanitizantes por meio da centrifugação ou filtração em membrana.

Em muitos métodos, dilui-se a mistura dos sanitizantes mais o microrganismo em solução de agentes neutralizantes Considera-se que somente a diluição não é suficiente para suprimir a atividade residual da maioria dos agentes químicos. Por exemplo, os compostos de amônio quaternário podem ter uma atividade bacteriostática contra certas espécies mesmo em altas diluições.

A neutralização corresponde a uma reação complexa ou simples. Por exemplo, ocorre uma neutralização puramente química quando se usa tiossulfato de sódio para controle residual de compostos iodados. No entanto, ocorrem reações mais complexas, quando os vários neutralizantes reagem com partes lipofílicas dos sanitizantes, inativando-os.

Dependendo das condições de teste, pode-se usar apenas um neutralizante ou, às vezes, é sugerida uma mistura de substâncias. Para compostos clorados e iodados, geralmente é indicado o tiossulfato de sódio. Para compostos de quaternário de amônio e clorohexidina, recomenda-se lecitina de ovo e Tween 80. Na literatura é recomendada uma solução contendo vários agentes neutralizantes, por exemplo bissulfito de sódio, tiossulfato de sódio, tioglicolato de sódio, Tween 80 e lecitina de soja, que poderia ser aplicada na maioria dos testes usados para avaliar a eficiência do sanitizante.

1.3. Teste do Coeficiente Fenólico

O teste de coeficiente fenólico foi, praticamente, o primeiro a ser desenvolvido com o propósito de avaliar a eficiência dos sanitizantes. A metodologia deste teste tem recebido várias propostas de modificações ao longo do tempo, permanecendo em todos eles o fundamento básico original: a comparação da eficiência de sanitizante contra uma solução-padrão de fenol, ambas atuando sobre células vegetativas de bactérias. É um método oficial preconizado pela *Association of Official Analitycal Chemists* (AOAC).

O teste é realizado sob condições rigidamente definidas. A AOAC recomenda como organismos de teste as culturas-teste de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhi* ATCC 6539 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. No Quadro 6, encontram-se resumidos o fundamento, a interpretação dos resultados e as limitações do teste do coeficiente fenólico, enquanto no Quadro 7 é mostrado um exemplo de cálculo de Coeficiente Fenólico (CF).

Quadro 6 - Fundamento, interpretação dos resultados e limitações do teste do coeficiente fenólico

Teste do coeficiente fenólico	
Fundamento	Compara a eficiência do sanitizante contra uma solução de fenol
Interpretação dos resultados	Determinação do coeficiente fenólico Diluição de uso
Limitações	Pouco reprodutível Possibilidade de sobrevivência de células muito resistentes Não permite simular condições usuais da indústria de alimentos Os resultados devem ser confirmados por outros testes Sua precisão é discutível

Quadro 7 - Exemplo de cálculo do coeficiente fenólico

Microrganismo avaliado *Salmonella typhi*	Tempo de contato (min)	
Diluição do sanitizante	5	10
1/200	-	-
1/300	-	-
1/450	+	-
1/500	+	+
Diluição do fenol		
1/90	+	-
1/100	+	+

\+ Houve crescimento
\- Ausência de crescimento

CF = 450/90 = 5.
Diluição de uso: 5 x 20 = 100.

Nesse exemplo, o coeficiente fenólico é igual a 5, que é determinado dividindo-se o inverso da maior diluição do sanitizante que inativa o microrganismo em 10 min em vez de 5 min pelo inverso da maior diluição do fenol, que conseguiu o mesmo resultado. Normalmente, aceita-se que a diluição de uso do sanitizante avaliado seja correspondente a 20 vezes o coeficiente fénolico determinado para *Salmonella tiphy*, sob as condições do teste. Nesse caso, a diluição de uso proposta seria uma parte do sanitizante para 100 partes de água, que corresponde a 100 $mg.L^{-1}$ do produto comercial. Essa diluição deve ser confirmada por outro teste, geralmente o de diluição de uso.

1.4. Teste de Capacidade

O teste de capacidade é recomendado principalmente para avaliar a possibilidade de reutilização de sanitizantes ou detergentes-sanitizantes, após consecutivos contatos com microrganismos e matéria orgânica. Consiste em adicionar determinada quantidade de inóculo à solução sanitizante a ser testado e, após o contato desejado, normalmente 1 min, transferir para o meio de subcultivo com inativador do agente químico. Depois de 30 seg da primeira exposição, adicionar outra quantidade de inóculo na mesma solução sanitizante, inativando-se após o tempo de contato desejado, por exemplo 1 min. O processo se repete, atingindo-se 10 adições consecutivas. Será aprovada no teste a diluição que apresentar crescimento microbiano em no máximo quatro tubos de subcultivo. No exemplo dos Quadros 8 e 9 é mostrada uma solução sanitizante aprovada, contendo 40 $mg.L^{-1}$.

Quadro 8 - Descrição de um teste de capacidade

Solução sanitizante	ABC
Microrganismo	*Escherichia coli*
Período de exposição	Um minuto
Meio de subcultivo	Caldo nutriente

Quadro 9 - Exemplo de resultado do teste de capacidade

Sanitizante ($mg.L^{-1}$)	Resultado do subcultivo										Tubos positivos
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	8
30	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	5
40	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	4
50	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1

+ Houve crescimento no meio de subcultivo.
- Não houve crescimento no meio de subcultivo.

1.5 Teste de Ação Esporicida

O teste esporicida é aplicável a substâncias químicas líquidas e gasosas, por meio do qual se constata ausência ou a presença da atividade esporicida. Consiste em submeter esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 e *Clostridium sporogenes* ATCC 1584, previamente secos e aderidos a cilindros de porcelana com 8 ±1 mm de diâmetro externo, 6 ±1 mm de diâmetro interno e 10 ±1 mm de comprimento, às soluções dos agentes químicos. Para ser classificado como esporicida, o agente químico na concentração, no tempo de contato recomendado e em outras condições avaliadas, deve eliminar os esporos em 118 dos 120 cilindros testados, metade deles com *Bacillus subtilis* e outra metade com *Clostridium sporogenes*. Quando o agente químico consegue eliminar os esporos em todos os cilindros, é classificado como esterilizante.

Várias pesquisas têm sido realizadas para avaliar a resistência de microrganismos a agentes químicos sanitizantes, sendo algumas delas sintetizadas a seguir.

2. Avaliação da Resistência de *Enterococcus faecium* Isolado de Leite Cru aos Agentes Químicos Sanitizantes

No Quadro 10 é mostrada uma síntese de pesquisa em que se estudou a resistência de *Enterococcus faecium* a agentes sanitizantes.

Quadro 10 - Síntese de pesquisa que avaliou a resistência de *Enterococcus faecium* a agentes sanitizantes (Fonte: OVIEDO, 1996).

Microrganismo	*Enterococcus faecium*, isolado de leite cru
Superfície	Aço inoxidável
Sanitizantes a 25 °C	Hipoclorito de sódio (100 mg.L^{-1} CRT, pH 8,0) Quaternário de amônio alcalino (1 %, pH 10,0) Ácido peracético (300 mg.L^{-1}, pH 2,9) Quaternário de amônio ácido (1 %, pH 2,0) Clorhexidina (solução 1:1000, pH 6,4) Dicloroisocianurato de sódio(150 mg.L^{-1} CRT, pH 8,4) Peróxido de hidrogênio (3 %) Extrato de semente de grape fruit (solução 1:250, pH 4,4) Iodóforo para equipamento (42 mg.L^{-1} IRL, pH 3,2) Iodóforo para manipulador (56 mg.L^{-1} IRT, pH 5,8)
Testes	Diluição de uso Suspensão

2.1. Avaliação pelo teste da diluição de uso

Com base no fundamento do teste de diluição de uso, os resultados desse experimento mostraram que somente o hipoclorito de sódio e o quaternário de amônio alcalino foram aprovados nas condições avaliadas, conforme mostrado na Figura 1.

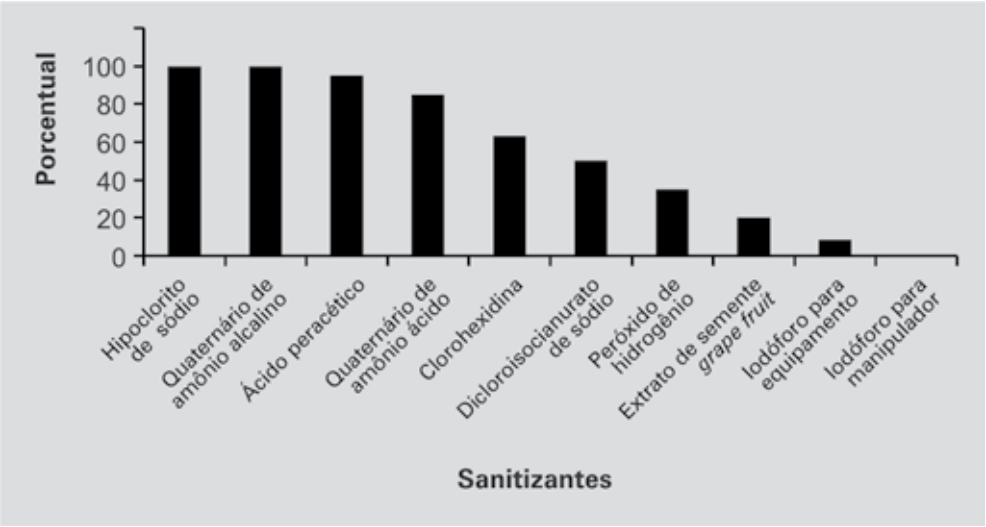


Figura 1 - Porcentual de tubos negativos no teste da diluição de uso para *Enterococcus faecium*, pela ação de agentes sanitizantes.

Verificou-se que o hipoclorito de sódio foi mais eficiente do que o dicloroisocianurato de sódio e existe explicação para essa diferença de ação bactericida. Sabe-se que o ácido hipocloroso (HClO), forma não dissociada, liberado em solução aquosa, é o responsável pela ação bactericida de ambos os compostos, conforme as equações químicas 1 e 2. No entanto, o hipoclorito de sódio, por ser um composto inorgânico, hidrolisa-se mais rapidamente em solução aquosa do que o dicloroisocianurato de sódio. Este último pertence à classe dos compostos clorados orgânicos, sendo quimicamente uma cloramina, cujo uso está em expansão no Brasil.

Equação 1) $NaClO + H_2O \rightleftharpoons HClO + NaOH$

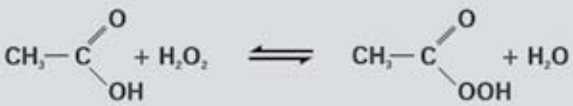
Equação 2) $= N - Cl + H_2O \rightleftharpoons HClO + = N - H$

O ácido dicloroisocianúrico apresenta uma estrutura química em que a liberação do HClO é dependente da inter-relação da concentração e do pH da solução sanitizante e do pKa do ácido hipocloroso (Eq. 3). Nesse experimento, foram usadas soluções de hipoclorito de sódio contendo 100 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre (CRL), em pH 8,0, e sal do ácido dicloroisocianúrico (dicloroisocianurato de sódio) contendo 150 $mg.L^{-1}$ de CRL em pH 8,4. Usando a equação 3, determinam-se as concentrações de 24 $mg.L^{-1}$ e 19 $mg.L^{-1}$ de HClO nas soluções de hipoclorito e de diclorocianurato. Assim, a liberação mais rápida e a maior concentração de HClO na solução preparada a partir do hipoclorito de sódio explicam sua maior eficiência.

Equação 3) $$mg.L^{-1} \text{ de } HClO = \frac{mg.L^{-1} \text{ CRL}}{1 + 10^{pH-7,5}}$$

Esse resultado indica a importância dos cuidados que se deve ter no uso de compostos clorados na indústria de alimentos. Dentre outros aspectos, é necessário saber se trata de composto orgânico ou inorgânico; conhecer a concentração do princípio ativo, facilmente determinado por titulação iodométrica, associada aos valores de pH; e armazenar os produtos comerciais sob condições adequadas, isto é, em recipientes escuros, bem fechados, em locais bem ventilados e de temperatura baixa, sendo os clorados inorgânicos mais instáveis ao armazenamento.

Formulações que têm ácido peracético como princípio ativo são constituídas de uma mistura estabilizada, contendo, ainda, peróxido de hidrogênio e ácido acético, além de um veículo estabilizante em equilíbrio, conforme equação 4.

Equação 4) 

Essas formulações são instáveis ao armazenamento, tóxicas aos manipuladores e corrosivas a diversas superfícies. Portanto, para assegurar eficiência do uso desse sanitizante nas indústrias de alimentos é necessário o controle da concentração do princípio ativo, assim como cuidados na manipulação e no armazenamento, sendo fundamental avaliar sua atividade microbicida.

No experimento, pode-se considerar que o produto comercial de extrato de semente de *grape fruit* não apresentou eficiência contra o *Enterococcus faecium*. No entanto, nessa concentração esse produto tem sido preconizado em diversas aplicações nas indústrias de alimentos. Sugere-se seu uso na sanitização de equipamentos, utensílios, ambientes e também na redução da microbiota das mãos de manipuladores de alimentos. Segundo os responsáveis pela comercialização desse extrato vegetal, é um produto com atividade antimicrobiana excelente e registrado no *Food and Drug Administration/USA* (FDA) e no Ministério da Saúde no Brasil.

Deve-se ressaltar que os resultados obtidos com os iodóforos foram inesperados, em comparação com os da literatura. Normalmente, as informações disponíveis sugerem que os compostos iodados são eficientes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, são relativamente eficientes contra fungos filamentosos e leveduras e de baixa eficiência contra bacteriófagos e esporos bacterianos.

2.2. Avaliação pelo Teste de Suspensão

A Figura 2 apresenta resultados da avaliação de diversos sanitizantes pelo teste de suspensão, realizada por Oviedo (1996). Verifica-se que as soluções de hipoclorito de sódio e ácido peracético que obtiveram 7,4 RD e a de dicloroisocianurato de sódio, que obteve 6,5 RD, foram aprovadas, considerando-se que esse teste laboratorial preconiza valores iguais ou superior a 5 RD em 30 seg de contato para aprovação.

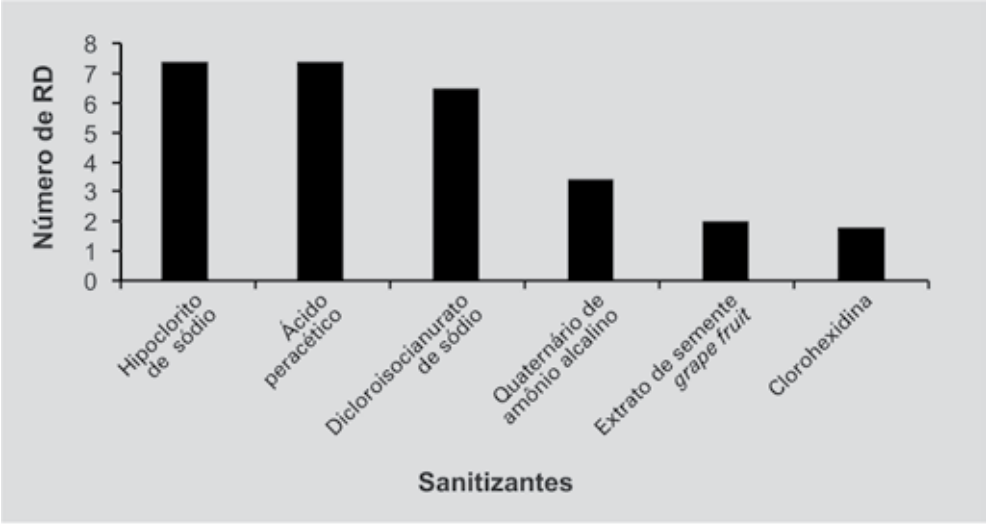


Figura 2 - Números de reduções decimais obtidos no teste de suspensão do *Enterococcus faecium*.

3. Eficiência do Ácido Peracético sobre Esporos de *Bacillus sporothermodurans* Avaliada pelos Testes de Diluição de Uso e de Suspensão

O Quadro 11 sintetiza a pesquisa que avaliou a eficiência do ácido peracético sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans*.

Quadro 11 - Síntese de pesquisa que avaliou a eficiência do ácido peracético sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans* (Fonte: Martins, 2001)

Microrganismo	Esporos de *Bacillus sporothermodurans*
Superfície	Aço inoxidável
Sanitizante	Ácido peracético
Teste	Suspensão (adaptado)

3.1. Avaliação pelo Teste da Diluição de Uso

Neste experimento, verificou-se que a adesão dos esporos de *Bacillus sporothermodurans* nos cilindros de aço inoxidável, utilizados para o teste de diluição de uso, aumentou com o tempo (Quadro 12). Após 30 min de contato, o número de esporos aderidos foi de $4{,}3x10^3$ UFC.cilindro^{-1}. Esses valores atingiram $5{,}1x10^4$ e $9{,}1x10^4$ UFC.cilindro^{-1} nos tempos de adesão de 12 h a 24 h, e em função desses resultados foi definido o tempo de adesão de 24 h, para efetuar os experimentos relativos à ação esporicida do ácido peracético.

Quadro 12 - Número de esporos de *Bacillus sporothermodurans* (UFC) aderidos a cilindros de aço inoxidável, à temperatura de 25 °C, em função do tempo de contato

Tempo de contato	UFC/cilindro
30 min	$4{,}3x10^3$
12 h	$5{,}1x10^4$
24 h	$9{,}1x10^4$

Pode-se considerar que o número de esporos aderidos após 24 h é satisfatório para a realização do teste de diluição de uso. Nesse tempo, foi obtido maior número de esporos aderidos ao aço inoxidável, melhorando a resposta sobre a avaliação esporicida do ácido peracético. Embora não tenha ocorrido um processo de formação de um biofilme, o número encontrado no cilindro caracteriza um processo de adesão bem estabelecido.

Avaliou-se também a eficiência de concentrações diferentes de ácido peracético a determinadas temperaturas sobre os esporos de *Bacillus sporothermodurans* em função do tempo de contato. O Quadro 13 mostra os valores experimentais das concentrações de ácido peracético em mg.L^{-1}, em que se obtém aprovação pelo teste de diluição de uso.

Quadro 13 - Concentrações de ácido peracético e tempos de contato aprovados a diferentes temperaturas no teste de diluição de uso sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans*

Temperatura	Tempo de contato (min)	Concentração de ácido peracético (mg.L^{-1})
4 °C	10	440
	15	395
	30	300
25 °C	10	265
	15	185
	30	140
40 °C	10	130
	15	85
	30	80

Conforme esperado, houve diminuição na concentração do agente esporicida com o aumento do tempo de contato, para aprovação no teste de diluição de uso. No entanto, os valores encontrados estavam acima daqueles recomendados pelo fabricante, que se situam entre 50 e 60 mg.L^{-1} de ácido peracético.

Esses dados indicam a importância de se determinar o princípio ativo nas soluções comerciais e nas soluções diluídas de ácido peracético, determinação de fácil execução e de grande importância para o controle da higienização numa indústria de alimentos. Uma vez determinado de forma inadequada, o sanitizante pode ser utilizado em concentrações abaixo das recomendadas, acarretando sanitização ineficiente e possível contaminação do produto alimentício durante o processamento, podendo reduzir a vida de prateleira do produto e, ou, colocar em risco a saúde do consumidor. Em contrapartida, sanitizantes usados em concentrações acima das recomendadas podem causar danos, como corrosão, nos equipamentos e tubulações de uma indústria, além de tornar o procedimento de sanitização antieconômico.

3.2. Avaliação pelo Teste de Suspensão

Para o teste de suspensão, utilizou-se uma metodologia adaptada, em que os esporos foram aderidos a cupons de aço inoxidável. Verificou-se que a solução sanitizante contendo 60 mg.L^{-1} de ácido peracético, em pH 3,3, temperatura de 25 °C e tempo de contato de 10 min, apresentou atividade esporicida nas suspensões de *B. sporothermodurans* em todos os tempos de adesão avaliados em seu experimento de acordo com o Quadro 14. Por exemplo, para 24 h de adesão, a solução sanitizante em 10 min de contato obteve 4,18 RD, ou seja, uma redução de 4,18 ciclos logarítmicos na população do esporo.

Quadro 14 - Reduções decimais nos esporos de *Bacillus sporothermodurans* aderidos a cupons de aço inoxidável, AISI 304, após ação de 60 mg.L^{-1} de ácido peracético, pH 3,3 a 25 °C, em 10 min de contato com o sanitizante e após diferentes tempos de adesão

Tempo de adesão (h)	0	2	4	8	12	24
RD	2,13	2,80	3,10	2,91	3,89	4,18

Há controvérsias quanto ao número de reduções decimais na população de esporos que define se uma solução sanitizante é eficiente ou não quando avaliado pelo teste de suspensão. Esse número somente é bem-estabelecido para células vegetativas de *Escherichia coli* ATCC 11229 e de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, em que se recomendam 5 RD na população desses microrganismos após a ação do sanitizante, em 30 seg de contato a 20 °C, para células planctônicas, ou seja, não aderidas a superfícies. Sugere-se que um sanitizante seja considerado esporicida, se atingir 3 RD em 30 min de contato, a 20 °C, quando os microrganismos estão aderidos.

Constatou-se que, à medida que aumentou o número de esporos aderidos, a eficiência do sanitizante foi mais elevada, o que pode ser explicado pela microtopografia da superfície de aço inoxidável, que observada pela microscopia eletrônica de varredura, por exemplo, apresenta fendas e ranhuras. Assim, a capacidade de proteção da superfície será maior quando o número de esporos for menor, considerando-se que essa capacidade será limitada.

3.3. O teste de Suspensão *versus* o Teste da Diluição de Uso

As informações sobre os experimentos realizados com testes de diluição de uso e de suspensão sugerem que os resultados desses testes laboratoriais devem ser usados com cuidado. Esses testes são recomendados e utilizados para avaliar a eficiência microbiológica dos sanitizantes químicos, no entanto são metodologias cujos fundamentos básicos são bastante diferentes. Por exemplo, no teste da diluição de uso exige-se eliminação completa dos microrganismos aderidos a cilindros de aço inoxidável, quando se sabe que as suspensões usadas nos processos de adesão geralmente podem ter microrganismos com resistências químicas diferentes, podendo interferir nos resultados. Deve se ressaltar que essa metodologia é recomendada pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos e pela Portaria 15/88 do Ministério da Saúde para avaliação da atividade antimicrobiana de sanitizantes para fins de registro.

No teste da suspensão, enumeram-se os sobreviventes, não exigindo, portanto, a eliminação completa dos microrganismos que não estão aderidos a nenhum suporte, sendo um teste amplamente aceito nos países europeus.

Apesar de apresentarem metodologias bem-estabelecidas, a execução desses testes não é simples, havendo possibilidade de ocorrerem erros em razão das diversas etapas de execução, como no preparo das soluções sanitizantes e das suspensões dos microrganismos, nos processos de adesão dos microrganismos no teste da diluição de uso e de neutralização no teste da suspensão nos meios de cultura usados, dentre outros.

Os resultados desses testes para aplicação na indústria de alimentos devem ser avaliados com precaução, sendo, no entanto, úteis para orientar quanto à eficiência bactericida dos sanitizantes usados nos procedimentos de higienização.

4. Modelagem Matemática na Relação Tempo e Concentração de Ácido Peracético na Ação Esporicida sobre *Bacillus sporothermodurans*

A aplicação de um modelo matemático para relacionar o tempo e a concentração na ação esporicida do ácido peracético é mostrada a seguir.

No Quadro 15, encontram-se as equações de regressão linear do logaritmo do tempo em função da concentração de ácido peracético nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 40 °C, em que não há esporos sobreviventes.

Quadro 15 - Regressão linear do logaritmo do tempo de contato (min) em função da concentração de ácido peracético nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 40 °C, em que não há esporos sobreviventes, determinada pelo teste da diluição de uso

Temperatura (°C)	Equações	R^2
4	$Log_{10} T_4 = 0,0039x+2,7168$	0,9320
25	$Log_{10} T_{25} = 0,0038x+1,9472$	0,9331
40	$Log_{10} T_{40} = 0,0067x+1,8352$	0,6662

A Figura 3 apresenta a relação entre o log_{10} do tempo de contato em função da concentração de ácido peracético, estimada pelas equações apresentadas no Quadro 15, nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 40 °C.

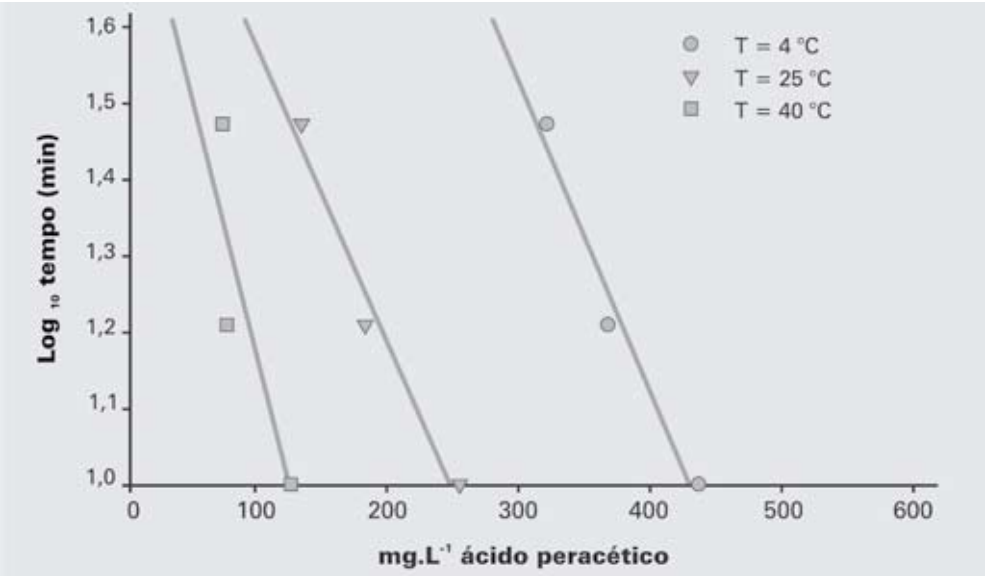


Figura 3 - Logaritmo do tempo de contato (min) em função da concentração de ácido peracético, em que não há esporos sobreviventes, determinada pelo teste da diluição de uso nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 40 °C.

Dessas equações foram obtidos os valores de Z, de acordo com o modelo $\mathbf{T = Tr \cdot 10^{Cr-C/Z}}$, sendo Z a variação na concentração de ácido peracético necessária para reduzir em 90% o valor do tempo de contato, sob as condições testadas.

De acordo com o modelo apresentado, Z será o inverso da inclinação da curva, ou:

$$Z = \frac{Cr - C}{\log T - \log Tr}$$

Desse modo, foram determinados os valores Z iguais a 256, 263 e 149 mg.L^{-1} de ácido peracético, nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 40 °C, respectivamente.

A partir dos valores de Z, podem-se determinar equações que associam tempo de contato e concentração, nas temperaturas utilizadas no experimento (Quadro 16).

Quadro 16 - Relação tempo de contato de 10 min e concentração na ação esporicida de ácido peracético (APA)

Temperatura (°C)	Equação	Faixa válida (mg.L^{-1} ácido peracético)
4	$T_4 = 10.10^{(440-C)/256}$	150 a 450
25	$T_{25} = 10.10^{(249-C)/263}$	25 a 270
40	$T_{40} = 10.10^{(125-C)/149}$	15 a 130

Em que: T=tempo de contato dos esporos de *Bacillus sporothermodurans* e o ácido peracético, a dada concentração (C); e C = concentração de ácido peracético, em mg.L^{-1}

Por exemplo, para um tempo de contato de 20 min a 4 °C, a concentração de ácido peracético determinada pela equação é de 363 mg.L^{-1}, para que não haja esporos sobreviventes. No entanto, se a concentração utilizada do sanitizante for de 110 mg.L^{-1} de ácido peracético, o tempo de contato a 40 °C determinado pela equação será de 13 min.

A determinação dessas equações é de importância para o monitoramento do binômio tempo/concentração para sanitização na indústria de alimentos. Se houver, por exemplo, alguma falha em relação à concentração na etapa de sanitização, com equações desse tipo é possível determinar o tempo necessário para se obter higienização adequada.

5 . Registro de Sanitizantes em Órgãos Governamentais

No Brasil, o Instituto Nacional de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz, do Ministério da Saúde, a rede de laboratórios do Ministério da Agricultura (MAPA) e alguns outros laboratórios credenciados para esse fim são responsáveis pela avaliação laboratorial da eficiência microbiológica de sanitizantes. Os produtos aprovados são liberados para comercialização, após registro na Divisão de Saneantes Dominissanitários (DISAD). O INCQS segue as metodologias utilizadas pela *Environmental Protection Agency* (EPA/USA) e propostas pela AOAC. Os sanitizantes são registrados e autorizados para uso, mediante a comprovação de sua eficácia aos fins propostos, através de análise prévia realizada com o produto acabado e nas diluições de uso indicadas pelo fabricante.

5.1. Informações para Registro

Para registro no Ministério da Saúde, uma série de informações sobre dados gerais do produto, produção e controle, dados físicos e químicos e dados complementares deve ser fornecida às autoridades competentes. Entre os dados gerais, são exigidos: i) marca do produto, ii) classe de uso, iii) estado físico, iv) embalagem, v) finalidade e instruções de uso, vi) limitações de uso e incompatibilidades, vii) prazo de validade e viii) cuidados para a conservação.

Com relação à produção e controle, há necessidade de se informar a fórmula completa, indicando os princípios ativos e demais componentes, relacionados pelos nomes técnicos ou químicos, em porcentagem peso/peso, peso/volume ou volume/volume. Além disso, devem-se descrever o processo de fabricação, o método para controle químico dos princípios ativos e adjuvantes relevantes no produto acabado e laudo de análise prévia.

É obrigatória também a informação sobre dados químicos e físicos do produto, como a fórmula estrutural dos princípios ativos, a densidade da formulação ou peso específico, o pH da formulação e da solução de uso proposta, a inflamabilidade e a corrosividade. Ainda, devem ser fornecidos às autoridades, para fins de registro, vários dados complementares, como inscrição dos componentes da fórmula em compêndios oficiais ou publicações de valor científico, finalidade de cada componente da fórmula e dados toxicológicos. E também dados sobre compatibilidade química entre embalagem e a formulação, condições ideais para transporte e armazenamento e outros elementos, inclusive os de causa e efeito, quando julgados necessários para a correta avaliação do pedido de registro.

5.2. Informações para Avaliação dos Princípios Ativos

Para avaliação, pela autoridade competente, dos princípios ativos dos produtos sanitizantes a serem registrados devem ser informados:

1. Os nomes químico e técnico que devem ser aprovados por entidade internacional.
2. A fórmula estrutural, a fórmula bruta.
3. A classe de uso.
4. O grau de pureza, a identidade e o teor de impurezas, a toxicidade das impurezas.
5. A densidade e o peso específico.
6. O ponto de fusão ou ebulição.
7. A pressão de vapor.
8. Solubilidade em água e solventes orgânicos.
9. O pH do produto técnico ou de solução a 1%.
10. O estado físico.

11. As características sensoriais, como cor e odor.

12. A descrição do método de identificação e qualificação química.

13. A inflamabilidade.

14. O grupo químico.

15. O método para destruição e inativação, em casos de acidentes com o meio ambiente.

16. As condições ideais de transporte e armazenagem.

17. Os dados toxicológicos.

18. A degradação no meio ambiente, relacionada a biodegradação, fotoacumulação e termoacumulação, meia-vida no ambiente e bioacumulação na cadeia alimentar e eficácia alimentar.

5.3 Rotulagem

A informações contidas nos rótulos dos produtos sanitizantes é de grande importância para o uso correto na indústria de alimentos. Essa rotulagem é definida pela legislação, conforme Portaria nº 15/88 do MS. No painel principal da embalagem, deve constar:

1. O nome do produto.

2. A classificação.

3. As frases relacionadas com a classe de risco, restrições de uso, se hospitalar, veterinário, indústria de alimentos ou profissional.

4. Modo de usar, diluição de uso, tempo de contato, sendo, por exemplo para a indústria de alimentos, esse tempo geralmente de 10 min.

5. As limitações de uso.

6. Os cuidados para a conservação - sensibilidade ao calor, umidade e luz solar.

7. Os princípio ativo, incluindo nomes químicos ou técnicos e os respectivos teores.

8. As frases de advertência e de primeiro socorros. É obrigatório que conste do rótulo a frase "Antes de usar, leia as instruções do rótulo".

9. O número de lote, data de fabricação e prazo de validade.

10. O número de registro com a sigla do órgão competente e o nome do responsável técnico com o número de inscrição no Conselho Regional de Farmácia ou de Química.

11. Os dados do fabricante, informando razão social e endereço do local de fabricação.

As frases de advertência e para primeiros socorros, em casos de acidentes, nos rótulos dos sanitizantes aumentam a segurança dos manipuladores desses produtos na indústria de alimentos. Elas devem constar do painel principal do rótulo e se relacionar com a classe de riscos do produto, que incluem: i) classe de risco I, deve apresentar as palavras em maiúscula e em destaque. Por exemplo, PERIGO! VENENO! (símbolo de caveira com tíbias cruzadas), fatal se ingerido, inalado, absorvido pela pele, conforme

o caso. Outro exemplo: PERIGO! VENENO! Causa queimaduras graves aos olhos, à pele, conforme o caso; ii) Classe de risco II, deve constar do rótulo a palavra CUIDADO, em destaque, e, conforme o caso, as informações "pode ser fatal se ingerido, inalado, absorvido pela pele" , ou "produto irritante para os olhos, a pele"; iii) Classe de risco III, deve constar do rótulo a palavra ATENÇÃO, em destaque e conforme o caso as informações "Não ingerir" ou "Evite inalação ou aspiração, contato com os olhos e contato com a pele. Classe de risco IV, deve constar do rótulo, conforme o caso, as informações "Não ingerir" ou "Evite a inalação ou aspiração", contato com os olhos e contato com a pele.

Além das citadas, as seguintes frases de advertência devem constar de todos os rótulos de produtos sanitizantes: i) Mantenha afastado de crianças; ii) Não dê nada por via oral a uma pessoa inconsciente; e iii) Não reutilize embalagens vazias.

Existem frases de advertências específicas com relação aos primeiros socorros que devem constar do rótulo de produto, no painel principal ou secundário, devendo ser selecionadas em função das características do produto, conforme é recomendação da Portaria nº 15/88 do MS. Como exemplo, pode-se citar: i) "Em caso de ingestão acidental, não provoque vômitos, faça beber água em abundância e procure socorro médico, levando a embalagem ou o rótulo do produto"; e ii) "Em caso de inalação ou aspiração, remova o paciente para local arejado e chame o socorro médico".

5.4. Classificação de Riscos dos Sanitizantes

A classificação de risco dos sanitizantes usados na indústria de alimentos e aprovados pela Portaria nº 15/88 do MS se fundamenta na apresentação de dados toxicológicos referentes às seguintes informações: i) irritabilidade dérmica e ii) irritabilidade ocular. Os sanitizantes não aprovados inicialmente devem ser submetidos a diversos ensaios complementares, em que se incluem: i) toxicidade aguda por via oral para ratos, com valores de DL_{50} e descrição dos sintomas observados; ii) toxicidade aguda via dérmica para ratos, com valores de DL_{50} e descrição dos sintomas observados; iii) toxicidade aguda via inalatória para ratos, com valores CL_{50} e descrição da sintomatologia observada; iv) testes de irritabilidade da pele e olhos em coelhos, sendo dispensável no caso de produtos com pH igual ou inferior a 2 ou igual ou superior a 11,5, enquadrados automaticamente na classe de risco I, por serem corrosivos; v) teste de sensibilização dérmica em cobaias; vi) teste para verificação de mutagenicidade "in vitro " e "in vivo"; vii) teste de toxicidade subcrônica (90 dias) via oral, em ratos; viii) teste para avaliação do metabolismo e excreção em ratos; ix) teste para verificação de efeitos teratogênicos em ratos e coelhos; x) teste via oral para verificação de efeitos carcinogênicos em camundongos e ratos,

com duração não inferior a 28 meses e 24 meses, respectivamente; xii) teste para avaliação de toxicidade crônica, via oral, com uma espécie roedora e outra não-roedora; xiii) teste para verificação de efeitos nocivos ao processo reprodutivo, em ratos, por no mínimo duas gerações; xiv) teste para verificação de toxicidade dérmica subaguda (durante 21 dias) em ratos ou coelhos; xv) teste para toxicidade inalatória subaguda (14 a 21 dias), em ratos; xvi) teste para verificação de neurotoxicidade retardada; xvii) testes complementares para enzimas específicas e xviii) dados sobre o emprego de antídotos, antagonistas e primeiros socorros para casos de intoxicação.

No Quadro 17 são apresentados critérios de classificação de risco toxicológico agudo.

Quadro 17 - Classificação de riscos toxicológicos agudo de sanitizantes

Classe	DL_{50} oral	DL_{50} dérmica	CL_{50} inalatória
I	≤ 50	≤ 200	< 0,2
II	> 50 e ≤ 500	> 200 e ≤ 2000	> 0,2 e ≤ 2
III	> 500 e ≤ 5000	> 2000 e ≤ 4000	> 2 e ≤ 20
IV	> 5000	> 4000	> 20

Dose letal - DL_{50} expressa em mg do produto por kg do animal em teste.
Concentração letal - CL_{50} expressas em mg do produto por volume em litros do ambiente de teste.

6. Sanitizantes Aprovados no Brasil

No Quadro 19 são apresentados os princípios ativos sanitizantes autorizados para uso na indústria de alimentos de acordo com a legislação brasileira.

A Resolução RDC nº 163, de 11 de setembro de 2001, aprova o regulamento técnico para produtos saneantes fortemente alcalinos e fortemente ácidos. Essa resolução levou em conta o fato de as formulações fortemente ácidas e alcalinas poderem causar danos à saúde humana. Tais formulações possuem valores de pH em solução 1% p/p, à temperatura de 25 °C, inferior ou igual a 2 ou superior ou igual a 11,5. A resolução prevê o tipo de embalagem a ser usado, o uso de tampas de dupla segurança, a necessidade de estudos de irritação/corrosão dérmica para fins de registro, a maneira adequada de rotulagem, frases e informações obrigatórias para os dizeres dos rótulos e recomendações para o uso seguro pelos manipuladores, dentre outros.

Quadro 19 - Princípios sanitizantes autorizados no Brasil

Grupos	Princípios ativos
Aldeídos	Formaldeído, glioxal, glutaraldeído e paraformaldeído
Fenólicos	Tercamilfenol; 2-benzil 4-clorofenol; 4-tercbutilfenol; cresóis 2-fenilfenol; 2-hidroxidifenileter e 2-hidroxi-2, 4, 4-triclorodifenileter
Quaternários de amônio	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio; cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio; cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio; cloreto de lauril piridínio; cloreto e brometo de cetil trimetil amônio; cloreto de alquil trimetil amônio; N,N dialquil N,N dimetil amônio; dicloreto de polioxietileno (dimetilimino) etileno (dimetilimino) e dicloreto de polioxitileno (dimetilimino) metileno (dimetilimino) etileno. Obs.: os radicais alquila estão compreendidos entre C8 e C18, sendo os mais efetivos os produtos resultantes da combinação C12 e C14
Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo	Hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio
Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo	Ácido dicloroisocianúrico e os sais de sódio e potássio; ácido tricloroisocianúrico; N, N-dicloroazodicarbonamidina; N, N-dicloro 4-carboxi benzenossulfonamida; N, N-dicloro metil benzenossulfonamida; N-cloro benzenossulfonamida sódica; N-cloro 4-metil benzenossulfonamida sódica; cloro suocinimida e 1,3-dicloro 5,5-dimetil hidantoína
Iodo e derivados	Iodo, iodo-povidona (PVP-I) e iodóforos
Biguanidas	Clorohexidina, cloridrato de polihexametileno biguanida
Peróxido inorgânico	Peróxido de hidrogênio
Peróxido orgânico	Ácido peracético

Fontes: Portaria nº15; de 23 de agosto de 1988, MS; Portaria nº 5/SVS/MS, de 13 novembro de 1989; Resolução nº 211/ANVISA/MS, de 18 junho de 1999; Portaria nº 122/DTN, de 19 novembro de 1993; Resolução RE nº 666,/ANVISA/MS, de 09 maio de 2001.

7. Conclusão

A seleção de sanitizantes para uso na indústria de alimentos deve passar por uma etapa em que se usam os testes laboratoriais, em particular os de diluição de uso e de suspensão. A partir dessa avaliação inicial, é que os sanitizantes serão submetidos às condições de aplicação industrial. Além disso, o teste de diluição de uso é o utilizado no Brasil para fins de avaliação antimicrobiana e registro dos sanitizantes no Ministério da Saúde.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n° 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. **Diário Oficial da União de 05 de setembro de 1988.**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução n° 211, de 18 de junho de 1999. **Altera texto do subitem 3 do item IV da Portaria de 15 de 23 de agosto de 1988.** Diário oficial da União de 21 de junho de 1999

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RE n° 666 de 9 de maio de 2001. Autoriza a inclusão das substâncias cloretos de N, N dialquil dimetil amônio, sendo alquil radicais de C8 a C16, no subanexo 1- item outros e no subanexo 2 item 2-"desinfetantes de uso geral. **Diário oficial da União de 14 de maio de 2001.**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC n° 163, de 11 de setembro de 2001. Aprova regulamento técnico para os produtos saneantes fortemente ácidos e fortemente alcalinos. **Diário Oficial de União de 12 de setembro de 2001.**

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1996. 182 p.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T.; ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainsless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 833-887, 1998.

ANDRADE, N.J. O uso de compostos clorados na indústria de laticínios. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.155, p.48-52, 1988.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th. Washington, D.C.,1998. 1141 p.

BELOIAN, A. DISINFECTANTS. In: CUNNIF, P. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists**. 16th. Washington, D.C.: AOAC, 1998. 1141 p

CREMIEUX, A.; FLEURETTE, J. Methods of testing disinfectants. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Desinfection, sterillization and preservation**. Philadelfia: Lea & Febiger, 1991. p.1009-1027.

CHEMIE. **Kilol-L:** O desinfetante ecológico. São José dos Campos, SP, [s.d.]. 14 p. (Folder).

GONTIJO FILHO, P. P.; ROMÃO, C.M.C.P.A. Testes microbiológicos e o registro de sanificantes, desinfetantes e antissépticos junto a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 17, p. 143-147, 1986.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE - INCQS. **Técnicas para controle de qualidade: avaliação da atividade antimicrobiana de saneamentos domissanitários**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1992. 105 p. (Manual técnico, 04/85).

LEITÃO, M.F.F. Avaliação da atividade germicida e desempenho de desinfetantes usados na indústria de alimentos. **Boletim SBCTA**, v.18, p.1-16, 1984.

MANUAL DIFCO. **Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiologia**. 10. ed. Detroit: Gráficas Letra, S.A., 1984. 1166p.

MARTINS, A. D.O. **Eficiência do ácido peracético sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans*.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 67 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OVIEDO, M. T. P. **Resistência de psicrotrófico acidificante isolado de leite cru a agentes sanitizantes**, Viçosa, MG: UFV, 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n° 5, de 13 de novembro de 1989. Monografia do cloridrato de polihexametileno de biguanida. **Diário Oficial da União de 14 de novembro de 1989.**

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n° 122 de 29 de novembro de 1993. Inclui na Portaria n° 15, de 23 de agosto de 1988, sub anexo1, alínea I, O princípio ácido peracético, para uso das formulações desinfetantes/esterilizantes. **Diário Oficial da União, de 01 de dezembro de 1993**.

TE GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; VAN DAM, W.F.; SLAGHUIS, B. ROMBOUTS, F.M. Sporicidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment, **International Biodeterioration and Biodegradation**. p.421-430, [S.l.:s.n.] 1995.

VORTEXX. [S.l.], 1999. (Informativo técnico).

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **Food Microbiology**, v. 23, p.125-148, 1994.